



**Universitat de les  
Illes Balears**

**Efecto de la hipermutación sobre la adaptación  
genética, persistencia y virulencia en la infección  
respiratoria crónica por *Pseudomonas aeruginosa*  
en pacientes con fibrosis quística**

**TESIS DOCTORAL**

**Ana Mena Ribas**

**2008**





**Universitat de les  
Illes Balears**



**Efecto de la hipermutación sobre la adaptación  
genética, persistencia y virulencia en la infección  
respiratoria crónica por *Pseudomonas aeruginosa*  
en pacientes con fibrosis quística**

**TESIS DOCTORAL**

**Ana Mena Ribas**

**2008**

---





**Universitat de les  
Illes Balears**



**Efecto de la hipermutación sobre la adaptación genética,  
persistencia y virulencia en la infección respiratoria  
crónica por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con  
fibrosis quística**

Memoria de tesis doctoral presentada por  
ANA MENA RIBAS  
para la obtención del grado de Doctora

VºBº DEL DIRECTOR DEL TRABAJO

Dr Antonio Oliver Palomo

Palma de Mallorca, 2008

---



---

A mis padres  
A mis hermanos  
A Kepa

---



## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Antonio Oliver, facultativo adjunto del Servicio de Microbiología del Hospital Son Dureta, ante todo, por el honor de haber contado con un científico tan brillante como director de esta tesis. Por haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación. Por todo lo que me ha enseñado a lo largo de estos años, tanto en el campo de la investigación como en mi formación como microbióloga clínica. Por su gran dedicación y perfeccionismo a la hora de plantear y desarrollar los trabajos. Por el apoyo y los ánimos que me ha dado en momentos de duda, ya que probablemente sin ellos no hubiese acabado esta tesis. Por sus buenos consejos y por su amistad.

Al Dr. José Luis Pérez, jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Son Dureta, por permitirme realizar los trabajos de investigación que componen esta tesis de manera paralela a mi formación como microbióloga clínica y a mi puesto actual como facultativa adjunta del servicio de Microbiología. Por todo lo que me ha enseñado a lo largo de mi formación e incluso después de ésta. Por darme la oportunidad de continuar formando parte de este servicio y por su ayuda en mis inicios como adjunta.

A la Dra. Núria Borrell, facultativa adjunta del Servicio de Microbiología del Hospital Son Dureta, por transmitirme su conocimiento y experiencia en modelos murinos de infección y su colaboración en el diseño y puesta a punto de los mismos. También por todo lo que me ha enseñado a lo largo de mi formación como microbióloga.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación, en especial a Mariló y a Tomeu por la realización del genotipado de los ratones así como por su participación en los modelos de colonización orofaríngea en ratones FQ. A Carlos y a Laura, por vuestra ayuda y en general a todos, por las risas en el laboratorio. A mis

compañeros de residencia, Carmen, Virginia, Enrique y en especial a Eva y a Olivia por vuestro compañerismo y los buenos momentos durante nuestros años de residencia (cuánto os echo de menos). También a los nuevos “resistentes” Xavi, Candi y Elena por la inyección de buen ambiente que aportan al laboratorio.

Al resto de adjuntos del Servicio de Microbiología, Dr. Alomar, Dr. Gil, Dr. Ramírez, Dr. Reina y Dr. Salvá, por los conocimientos que me han transmitido a lo largo de mis años de formación como microbióloga clínica.

A la Dra. Carmen Vidal, responsable de la Unidad de Secuenciación del Hospital Son Dureta, y también a Mamen, por las innumerables muestras secuenciadas.

A Teresa de Francisco, veterinaria del estabulario de la UIB, por su cooperación en la puesta a punto y desarrollo de los modelos animales.

Al Dr. Smith (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle), a la Dra. Burns y Dr. Moskowitz (University of Washington School of Medicine, Seattle), y al Dr. Speert (University of British Columbia and Child and Family Research Institute, BC Children's Hospital, Vancouver) por proporcionarnos su colección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con FQ.

A mis padres, por la educación que me han dado, por los esfuerzos que han realizado para que pudiera llegar hasta aquí y por apoyarme y creer en mí siempre. También a mis hermanos por apoyarme y por ser como son.

A mis amigos, en especial a Sandra y a Jana, por aguantar mis agobios y mis “rollos” sobre este trabajo.

A Kepa, por hacer el mayor esfuerzo de todos para que yo pudiera acabar esta tesis, por animarme, por aguantarme y sobre todo, por estar a mi lado.

# Índice

Abreviaturas.....	1
I. Introducción.....	5
1 Fibrosis quística.....	7
1.1 Generalidades.....	7
1.2 Patogénesis de la infección crónica de las vías respiratorias en la fibrosis quística .....	10
1.3 Aspectos microbiológicos de la infección pulmonar en la FQ.....	14
1.4 Patógenos implicados en la colonización e infección pulmonar .....	15
2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
2.1 Características generales.....	23
2.2 Importancia clínica.....	25
2.3 Virulencia.....	27
2.4 Resistencia a los antibióticos.....	36
2.4.1 Principales mecanismos de resistencia.....	38
3 Infección pulmonar crónica por <i>P. aeruginosa</i> en los pacientes FQ .....	43
3.1 Adaptación fisiológica en la infección crónica: biofilms.....	45
3.2 Evolución de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en la IPC: mutaciones adaptativas para la persistencia.....	48

3.3	Hiperproducción de alginato (fenotipo mucoide).....	49
3.4	Colonias enanas o puntiformes ( <i>Small colony variants</i> ) .....	51
3.5	Variantes inmóviles.....	52
3.6	Otras mutaciones adaptativas .....	52
4	Hipermutación.....	55
4.1	Bases genéticas de la hipermutación .....	55
4.2	Hipermutación y adaptación .....	59
4.3	Hipermutación y virulencia	60
4.4	Hipermutación en poblaciones bacterianas naturales .....	61
4.5	Hipermutación y resistencia a los antibióticos .....	63
5	Modelos murinos de IPC por <i>P. aeruginosa</i> .....	67
5.1	Vehiculación de la cepa bacteriana.....	67
5.2	Inoculación.....	68
5.3	Animales.....	70
5.4	Aplicaciones de los modelos murinos de IPC por <i>P. aeruginosa</i> .....	72
II.	Hipótesis y objetivos.....	75

III. Materiales y métodos.....	79
1 Efecto de la inactivación del sistema MMR sobre el <i>fitness</i> , la virulencia y la persistencia de <i>P. aeruginosa</i> : experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	81
1.1 Cepas bacterianas y plásmidos.....	81
1.2 Experimentos de competición <i>in vitro</i> .....	81
1.3 Modelo de infección sistémica aguda en ratones.....	83
1.4 Modelo de infección respiratoria aguda en ratones.....	83
1.5 Modelo de colonización orofaríngea en ratones con FQ.....	85
1.6 Tipificación molecular.....	88
1.7 Análisis estadístico.....	89
2 Papel de la hipermutación en la adaptación genética de <i>P. aeruginosa</i> : estudio secuencial de la IRC en pacientes FQ.....	90
2.1 Cepas bacterianas.....	90
2.2 Construcción de mutantes deficientes en los genes <i>mucA</i> (PAOMA), <i>mutS</i> (PAOMS) y <i>mucA-mutS</i> (PAOMSA).....	95
2.3 Determinación de las frecuencias de mutación.....	101
2.4 Complementación de las cepas hipermutadoras con los genes <i>wild-type</i> del sistema MMR.....	102
2.4.1 Construcción del plásmido pUCPML.....	102
2.4.2 Estudios de complementación.....	102
2.5 Amplificación por PCR y secuenciación de los genes MMR.....	103
2.6 Tipificación molecular de las cepas.....	106

2.7	Análisis estadístico.....	106
IV.	Resultados.....	107
1.	Efecto de la inactivación del sistema MMR sobre el <i>fitness</i> , la virulencia y la persistencia de <i>P. aeruginosa</i> : experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	109
1.1	Experimentos de competición <i>in vitro</i> .....	109
1.2	Modelos murinos de infección aguda .....	110
1.3	Modelo de colonización orofaríngea en ratones FQ .....	111
2	Papel de la hipermutación en la adaptación genética de <i>P. aeruginosa</i> : estudio secuencial de la IRC en pacientes FQ.....	115
2.1	Prevalencia y naturaleza de las cepas hipermutadoras.....	115
2.2	Hipermutación y adaptación genética de <i>P. aeruginosa</i> a las vías respiratorias de los pacientes FQ.....	128
V.	Discusión .....	137
1.	Efecto de la inactivación del sistema MMR sobre el <i>fitness</i> y la virulencia..	139
2.	Efecto de la hipermutación sobre la adaptación y evolución bacteriana en modelos experimentales.....	141
3.	Hipermutación en poblaciones bacterianas naturales.....	144
4.	Bases genéticas de la hipermutación en poblaciones naturales.....	146
5.	Papel de la hipermutación en la adaptación y evolución en poblaciones bacterianas naturales.....	148

VI. Conclusiones.....	<b>155</b>
VII. Referencias bibliográficas.....	<b>161</b>
VIII. Anexo I: medios de cultivo y reactivos.....	<b>195</b>
IX. Anexo II: artículos publicados.....	<b>199</b>



# Abreviaturas

(orden alfabético)

**A:** adenina

**AAC:** acetiltransferasa

**ADN:** ácido desoxirribonucleico

**ADP:** adenosín difosfato

**Ala:** alanina

**AMC:** amoxicilina-ácido clavulánico

**Arg:** arginina

**ARNt:** ácido ribonucleico de transferencia

**Asn:** asparagina

**Asp:** ácido aspártico

**ATP:** adenosín trifosfato

**BAL:** lavado broncoalveolar

**BHI** (*Brain Heart Infusion*): infusión cerebro-corazón

**BLEE:**  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

**C:** citosina

**CMI:** concentración mínima inhibitoria.

**CFTR** (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*): regulador de la conductancia transmembrana de fibrosis quística

**Cys:** cisteína

**DAM:** deoxiadenina metil-transferasa

**DDMR** (*Dam directed mismatch repair*): sistema de reparación de emparejamientos erróneos dirigida por Dam

**DMSO:** dimetil sulfóxido

**DO:** densidad óptica

**EDTA:** ácido etileno-diamino-tetra-acético

**EPOC:** enfermedad pulmonar obstructiva crónica

**Exo:** exotoxina

**FQ:** fibrosis quística

**G:** guanina

**Glu:** ácido glutámico

**Gln:** glutamina

**Gly:** glicina

**GO:** oxoguanina

**8-oxodG:** 8-oxo-7,8-dihydroguanina

**3OC<sub>12</sub>-HSL:** *N*-(3-oxodecanoil)-L-homoserina lactona

**C<sub>4</sub>-HSL:** *N*-butiril-L-homoserina lactona

**IC:** índice de competición

**IL:** interleukina

**Ile:** isoleucina

**IPC:** infección pulmonar crónica

**IRC:** infección respiratoria crónica

**Kb:** kilobase

**Km:** kanamicina

**LB:** Luria-Bertani (agar o caldo)

**Leu:** leucina

**LPS:** lipopolisacárido

**LPV:** leucocidina Panton Valentine

**LT:** leucotrieno

**Lys:** lisina

**MBL:** metalo- $\beta$ -lactamasa

**MCS** (*Multi-Cloning Site*): sitio de multiclonaje

**MDMR** (*Methyl Directed Mismatch Repair*): sistema de reparación de emparejamientos erróneos dependiente de metilación

**MH:** Muller-Hinton (agar o caldo)

**MMR** (*Mismatch Repair*): sistema de reparación de emparejamientos erróneos

**NAC:** neumonía adquirida en la comunidad

**nt:** nucleótido

**NTHi:** *H. influenzae* no tipificable

**Ori:** origen de replicación

**pb:** pares de bases

**PCR** (*Polimerase Chain Reaction*): reacción en cadena de la polimerasa

**PFGE** (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*): electroforesis de campo pulsado

**Phe:** fenilalanina

**Plc:** fosfolipasa C

**PMN:** polimorfonucleares

**PQS:** *Pseudomonas quinolone signal*

**Pro:** prolina

**QS** (*Quorum Sensing*): sistema sensor de densidad de población

**R:** receptor

**Rhl:** ramnolípido

**Rif:** rifampicina

**rpm:** revoluciones por minuto

**SARM:** *S. aureus* resistente a metilina

**SCV** (*Small Colony Variant*): fenotipo enano o puntiforme

**Ser:** serina

**SMR:** subpoblaciones de mutantes resistentes

**Str:** estreptomicina

**T:** timina

**Thr:** treonina

**TLR:** receptor *Toll like*

**TNF** (*Tumor Necrosis Factor*): factor de necrosis tumoral

**Tyr:** tirosina

**UCI:** unidad de cuidados intensivos

**UFC:** unidad formadora de colonias

**UV:** ultravioleta

**Val:** valina

**VAP** (*Ventilator Associated Pneumonia*): neumonía asociada a la ventilación mecánica

**WT** (*Wilde-Type*): salvaje.



# I. Introducción

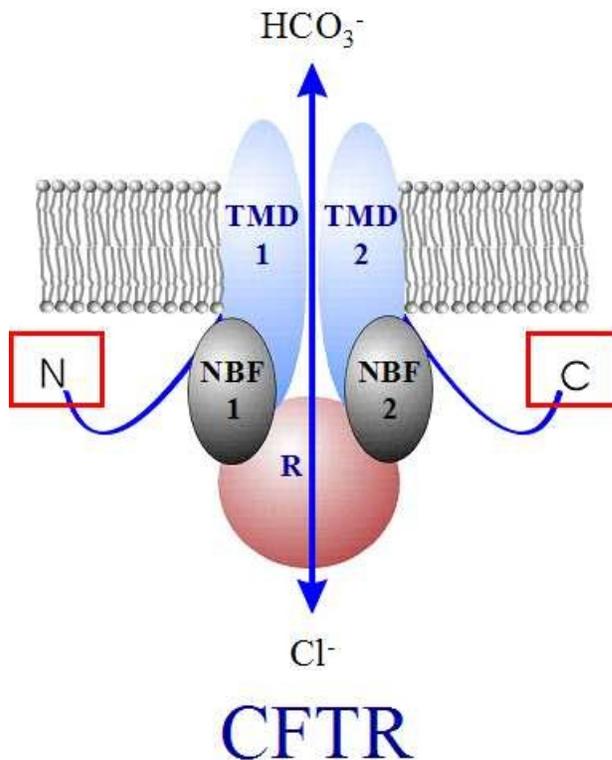


# 1 Fibrosis quística

## 1.1 Generalidades

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria autosómica recesiva más frecuente en la población de origen europeo (principalmente caucásica) y la primera causa de patología pulmonar crónica en la infancia. Su frecuencia estimada en la población general varía entre 1 de cada 2500 o 1 de cada 5000 recién nacidos vivos, lo que establece una frecuencia de 1 portador por cada 25-50 individuos de la población general, variando entre los diferentes grupos étnicos (Dapena Fernández 1998).

El descubrimiento del gen de la FQ en 1989 permitió profundizar en el conocimiento de esta enfermedad. Este gen ha sido identificado, clonado y secuenciado y la estructura de la proteína resultante analizada (Kerem y col., 1989; Riordan y col., 1989; Rommens y col., 1989) (Figura 1). De este modo, se ha llegado a conocer que esta enfermedad se origina debido a mutaciones en el gen que codifica para el regulador de la conductancia transmembrana de FQ (CFTR), situado en el brazo largo del cromosoma 7. Este gen tiene un tamaño de 250 Kb, está compuesto por 27 exones y codifica para un canal de cloro epitelial que pertenece a la familia de transportadores ABC (*ATP binding cassette*) y se encuentra en todos los tejidos exocrinos (Drumm y col. 1990, Bear y col. 1992). La mutación más común es la delección de la fenilalanina de la posición 508 ( $\Delta F508$ ), encontrándose hasta en el 70% de los enfermos de FQ. El defecto en el transporte del ión cloro provoca que estos enfermos tengan un sudor característicamente salado y conduce a una deshidratación de las secreciones del tracto respiratorio, pancreáticas, hepáticas, intestinales y genitourinarias aumentando así su viscosidad (Gibson y col., 2003; Ratjen y col., 2003; Robinson 2001). Como consecuencia de estas alteraciones las principales manifestaciones clínicas en estos enfermos se producen a nivel respiratorio, gastrointestinal y genitourinario. Algunas de ellas se describen brevemente a continuación.



**Figura 1.** Estructura propuesta de CFTR, con 12 dominios transmembrana, 2 dominios vinculantes de nucleótidos y un dominio regulador en el centro (imagen obtenida de Human genome Cystic Fibrosis ©J. Wine 2003).

(Govan y Deretic 1996; Lyczak y col., 2002). La afectación pulmonar, que constituye la causa más frecuente de mortalidad en los pacientes afectados de FQ, presenta una gran heterogeneidad tanto en la edad de comienzo como en la progresión (Watson y col., 2004). Las principales manifestaciones respiratorias incluyen tos persistente y productiva, bronquiolitis, asma, poliposis nasal, sinusitis, enfermedad respiratoria obstructiva con progresión a bronquitis crónica, bronquiectasias acompañado de exacerbaciones agudas caracterizadas por aumento de la tos, taquipnea, disnea, aumento de la producción de esputo y pérdida de peso.

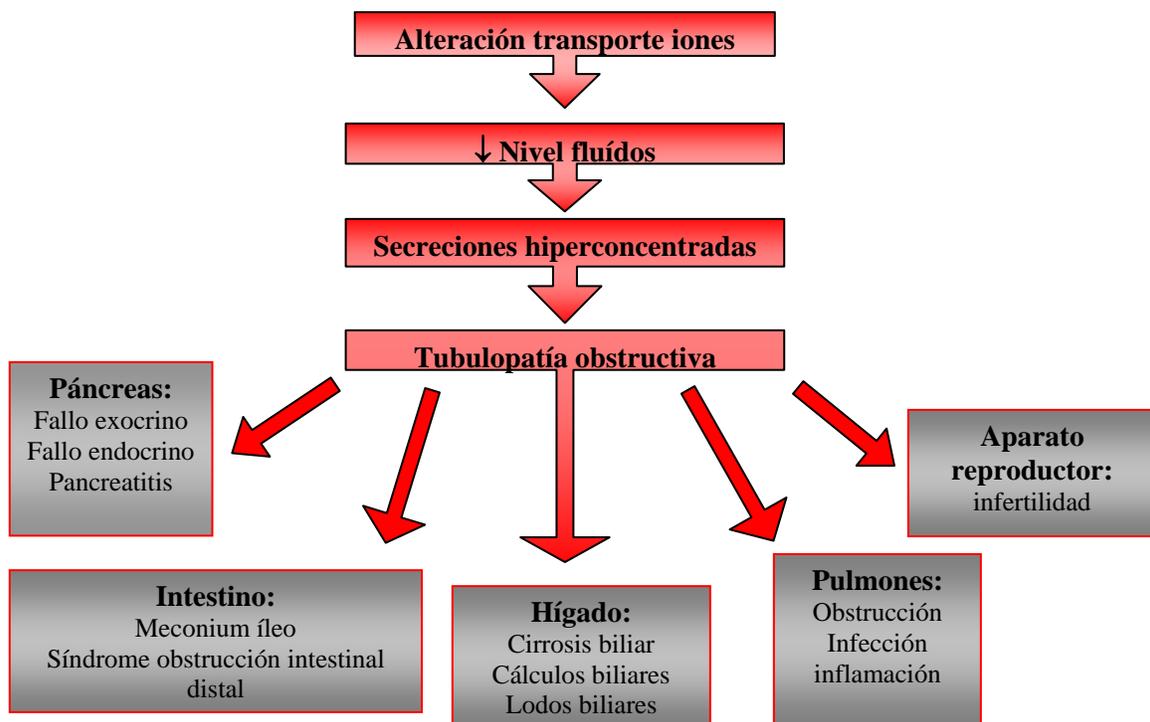
**Gastrointestinal.** La insuficiencia pancreática aparece desde el nacimiento en muchos pacientes. La secreción insuficiente de enzimas lleva a una mala absorción de las grasas y proteínas. También puede provocar alteraciones en el

**Respiratorio.** La deshidratación y el aumento de sulfatación de los proteoglicanos del moco que recubre el epitelio ciliado de los pacientes FQ (Boat y col., 1989; Cheng y col., 1989) aumenta notablemente la viscosidad de las secreciones creando un caldo de cultivo idóneo para el crecimiento de microorganismos, que acompañado de problemas en las defensas anti-infectivas favorecen las infecciones pulmonares crónicas (IPC), predominantemente por *Pseudomonas aeruginosa*

crecimiento normal en los niños, así como diversas alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Otras alteraciones a nivel gastrointestinal pueden ser el meconium íleo, prolapso rectal, síndrome de la obstrucción intestinal distal, edema hipoproteinémico, ictericia neonatal prolongada, cirrosis biliar con hipertensión portal, deficiencia de vitaminas (A, D, E, K), pancreatitis recurrentes, etc. Las alteraciones digestivas fueron las principales responsables de mortalidad temprana en estos pacientes hasta mediados del siglo pasado, provocando que hasta el 70% de los pacientes falleciera antes de cumplir un año de vida.

**Genitourinario.** Los trastornos, sobre todo en el transporte del espermatozoides, provocan que más del 95% de los hombres FQ sean estériles mientras que la incidencia en las mujeres es de un 20%.

**Otras.** Alcalosis hipoclorémica e hiponatrémica, pseudotumor cerebral, etc.



**Figura 2.** Esquema de la patogénesis en la fibrosis quística.

## 1.2 Patogénesis de la infección crónica de las vías respiratorias en la fibrosis quística

Como ya se ha comentado en el apartado anterior la FQ se debe a la alteración de la expresión de la proteína CFTR. En la tráquea y en los bronquios esta proteína se expresa sobre todo en las glándulas submucosas, mientras que su expresión es menor en las células epiteliales de la superficie. Las glándulas submucosas, por lo tanto, desempeñan un importante papel en la patogénesis de la FQ en las vías respiratorias. De hecho, una de las primeras manifestaciones que se observan en este tipo de pacientes es la obstrucción de estas glándulas, impidiendo la salida de productos antibacterianos y antiinflamatorios que segregan normalmente y cuya ausencia favorece la colonización bacteriana (Dapena Fernández 1998).

En los enfermos FQ la secreción mucosa, que se encarga de arrastrar partículas extrañas y microorganismos a su paso sobre el epitelio ciliado hacia el exterior, presenta una hipersulfatación de los proteoglicanos y una deshidratación que dan lugar a la aparición de un moco viscoso hiperosmolar empeorando así el aclaramiento mucociliar y la actividad de los péptidos antimicrobianos naturales (Gilligan 1991; Goldman y col., 1997). Esto es debido, en parte, a la mutación en el gen *cftr*, y por tanto, a la alteración en el transporte de iones a través del canal para el que codifica. Existen dos hipótesis que intentan explicar la relación entre la alteración de la composición iónica de la capa líquida de la superficie de las vías respiratorias y la infección microbiana (Gibson y col., 2003):

- 1 La primera hipótesis se basa en un fallo de la secreción de  $\text{Cl}^-$  y agua hacia el exterior, debido a la alteración en CFTR, dando lugar a una mayor absorción de  $\text{Na}^+$  y agua que alteraría la composición de las secreciones respiratorias, dificultando por tanto el aclaramiento mucociliar y favoreciendo la aparición de infecciones.
- 2 La segunda hipótesis se basa en el fallo de los mecanismos de transporte

iónico en los que el  $\text{Cl}^-$  no puede absorberse por la alteración de los canales CFTR alterando también la absorción de  $\text{Na}^+$ . Esto provocaría un aumento de la concentración de NaCl en la capa de líquido provocando la inactivación de las  $\beta$ -defensinas y disminuyendo, por tanto la capacidad antibacteriana de la capa líquida de la superficie del tracto respiratorio. (Smith 1996; Smith y col., 1996; Welsh y Quinton 1996).

Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que también existe una deficiencia en el transporte de  $\text{HCO}_3^-$  que puede ser incluso más importante en la patogénesis que el defecto en el transporte de  $\text{Cl}^-$ . Esto se basa en el hecho de que durante el proceso de liberación de mucinas de gránulos intracelulares, los cationes de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{H}^+$  deben ser desplazados para permitir que dichas mucinas se expandan unas 1000 veces formando una capa extracelular de gel mucoso. El  $\text{HCO}_3^-$ , por tanto, resultaría crucial para la expansión normal de las mucinas, ya que forma complejos con estos cationes, de manera que su secreción defectuosa provocaría que las mucinas permanezcan agregadas, mal solubilizadas y sean menos transportables (Quinton 2008).

Todo esto va acompañado de otro factor patogénico adicional, una intensa respuesta inflamatoria en la que participan células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos) que activan los linfocitos CD4 iniciando una respuesta inmunológica. La persistencia de la infección provoca la infiltración continua de neutrófilos que liberan gran cantidad de elastasas y radicales oxidativos desbordando las defensas naturales del pulmón y provocando lesiones a nivel de proteínas estructurales causando bronquiectasias y fibrosis. Además, la elastasa de los neutrófilos contribuye al mantenimiento de la inflamación-infección debido a que impide la fagocitosis bacteriana mediada por el complemento y destruye los anticuerpos IgG (Dapena Fernández 1998). La IL-8 parece ser el principal quimiotáctico de los neutrófilos (otros son el TNF- $\alpha$ , la IL-1 o leucotrieno B<sub>4</sub>) y también estimula la hiperplasia de las células secretoras de moco y, por tanto, la formación de tapones mucosos. Los fagocitos, a su vez, producen citoquinas quimiotácticas como LT-B4 e IL-8 que aumentan todavía más la infiltración de

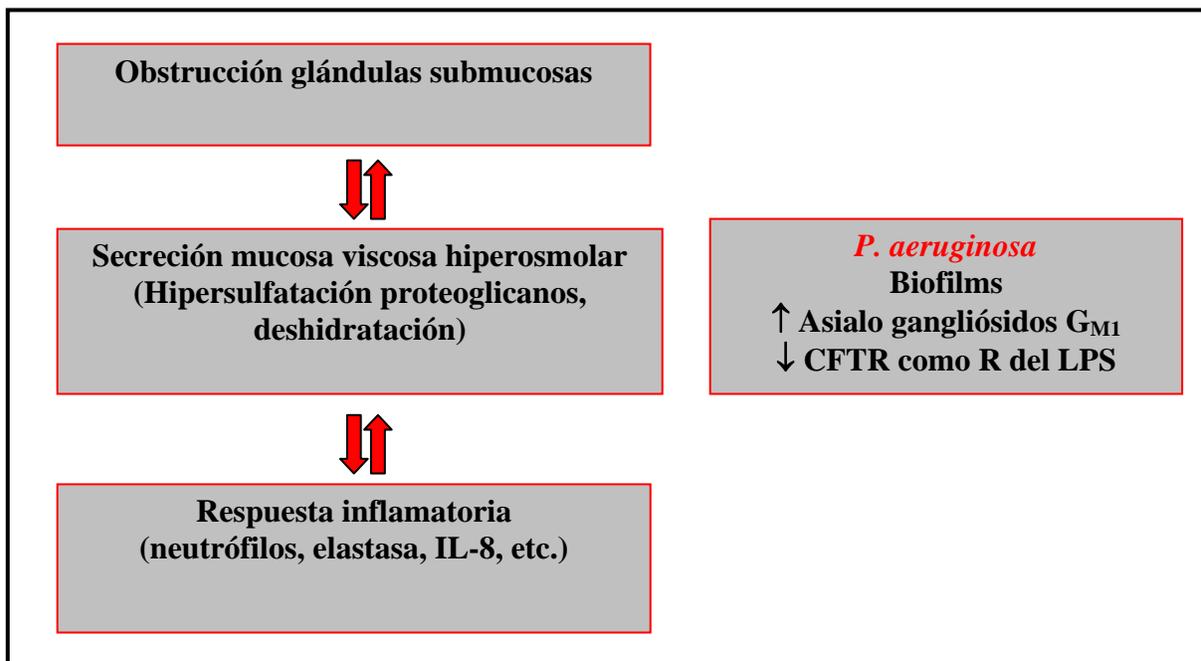
neutrófilos. También se ha visto que la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , la elastasa neutrófila, el LPS así como ciertos antígenos de *P. aeruginosa* pueden estimular la producción de IL-8 (Gibson y col., 2003). Además, en los enfermos FQ está disminuida la secreción de IL-10 por parte de las células epiteliales respiratorias, que en los individuos sanos disminuye la producción de citocinas proinflamatorias de los macrófagos y neutrófilos. Otro factor que influye en la patogénesis es la muerte celular, sobre todo de neutrófilos, ya que se liberan grandes cantidades de ADN y actina que aumentan la viscosidad del moco y dificultan aún más el aclaramiento. También se ha observado que existe un incremento de la señal intracelular del Ca<sup>2+</sup> en el epitelio de estos pacientes FQ que, por lo tanto, se traduce en un incremento de la respuesta inflamatoria (Ribeiro 2006).

Algunos investigadores están estudiando la posibilidad de que el incremento de mediadores de la inflamación que se observa en los pulmones de pacientes FQ sea una propiedad intrínseca del propio epitelio, quizás una respuesta inflamatoria exagerada debida a patógenos tempranos como *S. aureus* que han sido eliminados o son indetectables por cultivo (Lyczak y col., 2002).

Toda esta situación tiende a cronificarse ya que aunque se consiga la erradicación de la bacteria las condiciones continúan siendo favorables y las vías aéreas se reinfectan continuamente. *P. aeruginosa* es la bacteria que más comúnmente causa colonización e infección crónica de las vías aéreas en este tipo de enfermos. Algunos mecanismos que facilitan esto es la capacidad que tienen para agruparse en macrocolonias (biofilms) para no ser fagocitadas, o la mayor disponibilidad de receptores en las células epiteliales ya que se produce un incremento de asialogangliósidos G<sub>M1</sub> en las células epiteliales que actúan como receptores que promueven la adhesión de los pili bacterianos (Inmundo y col., 1995) favoreciendo la persistencia en las vías respiratorias. Además, dependiendo del tipo de mutación en CFTR, existe un aclaramiento más o menos disminuido (entre 10 y 50 veces) de *P. aeruginosa* por las células epiteliales, ya que CFTR actúa normalmente como receptor del LPS, mediando la internalización de las bacterias mediante endocitosis como mecanismo de defensa del huésped (Pier y

col., 1996; Pier 2000). Estudios recientes han identificado numerosos factores CFTR dependientes relacionados con la respuesta de la membrana plasmática epitelial a la infección y que son necesarios para el aclaramiento bacteriano (Campodónico y col., 2008).

Se ha demostrado, también, la existencia de un nuevo mecanismo de defensa innato en las vías aéreas normales que destruye la bacteria mediante la formación de hipotiocianito y que parece ser defectivo en las células epiteliales de los enfermos FQ que no secretan suficiente tiocianato, necesario, junto con la lactoperoxidasa, para la formación del hipotiocianito (Moskwa y col., 2007). Por otra parte, varios estudios han demostrado, que la concentración de hierro está aumentada en las secreciones respiratorias de los pacientes FQ, lo cual parece favorecer la persistencia de la colonización por *P. aeruginosa*. Asimismo, estudios recientes sugieren que la alteración de CFTR en los macrófagos alveolares reduce la acidificación de los fagolisosomas, limitando su capacidad bactericida y promoviendo, por tanto, la persistencia de la infección. Todo esto demuestra la complejidad y la cantidad de mecanismos que pueden estar implicados en la patogénesis de esta enfermedad.



**Figura 3.** Esquema de la patogénesis de la infección crónica de las vías respiratorias en la fibrosis quística.

### 1.3 Aspectos microbiológicos de la infección pulmonar en la FQ

La infección pulmonar es la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes con mucoviscidosis. *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* son los patógenos que se aíslan con más frecuencia en los pacientes FQ. Generalmente, los dos primeros microorganismos se aíslan en los primeros años de vida de este tipo de pacientes, mientras que *P. aeruginosa* suele aparecer por primera vez en la adolescencia.

Al principio son frecuentes las infecciones por virus respiratorios (adenovirus, rinovirus y coronavirus), micoplasmas y neumococo. Se cree que el efecto de los virus sobre el epitelio respiratorio podría favorecer las colonizaciones secundarias por *S. aureus*, *H. influenzae* o *P. aeruginosa* que se producen posteriormente. En estas edades más intermedias es infrecuente el aislamiento de *Streptococcus pneumoniae*, y de enterobacterias o bacilos gram negativos no fermentadores (Cantón y col., 1998).

En los pacientes adultos es frecuente la aparición de bacterias multirresistentes, entre ellas *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* o *Achromobacter xylosoxidans*, debido a la continua administración de terapias antimicrobianas de amplio espectro. Algunas como *Burkholderia cepacia* se asocian a mal pronóstico y evolución de la enfermedad. Estos tratamientos también favorecen la aparición de levaduras como *Candida* sp, hongos filamentosos, principalmente *Aspergillus* sp y micobacterias atípicas, generalmente *Mycobacterium avium*. Aunque, en general, las exacerbaciones que se producen en los pacientes adultos son de tipo bacteriano (Cantón y col., 1998).

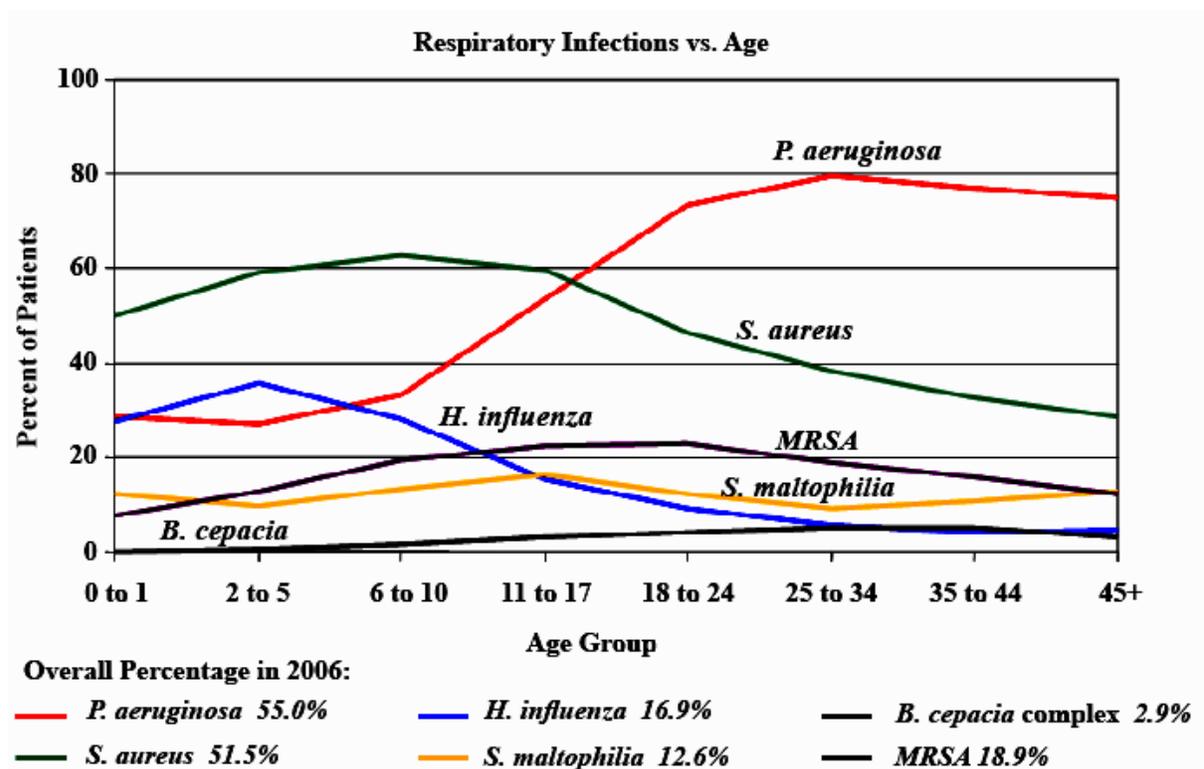
En los últimos años, gracias a la aplicación de nuevas técnicas de diagnóstico microbiológico molecular se han identificado nuevos microorganismos en las secreciones respiratorias de estos pacientes, aunque su importancia patogénica es incierta. Entre ellos destacan *Inquilinus limosus* y diversas especies de los géneros *Pandoraea*, *Ralstonia* y *Burkholderia*.

Cabe comentar, también, que hasta en el 70% de los pacientes pueden coexistir diferentes patógenos. En más del 50% de ellos aparecen simultáneamente *S.*

*aureus* y *P. aeruginosa*, solos o en asociación con *H. influenzae* o *S. pneumoniae*.

#### 1.4 Patógenos implicados en la colonización e infección pulmonar

En la FQ el daño pulmonar se produce principalmente por las continuas exacerbaciones pulmonares producidas por los diferentes patógenos que colonizan las vías respiratorias de estos pacientes a lo largo de los años. En la gráfica se muestran los principales patógenos causantes de infección respiratoria dependiendo de la edad (datos de Cystic Fibrosis Foundation 2006).



***Staphylococcus aureus***. Fue el primer patógeno reconocido causante de este tipo de infecciones pulmonares en los pacientes con FQ. En la actualidad se aísla aproximadamente en un 50% de los pacientes (Cystic Fibrosis Foundation 2006) presentando una mayor incidencia durante los cinco primeros años de vida. En la era preantibiótica las infecciones por *S. aureus* suponían la principal causa de

mortalidad en los pacientes FQ. Gracias a los tratamientos antiestafilocócicos con antimicrobianos como la oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, ácido fusídico; y a la profilaxis de larga duración con cotrimoxazol, tetraciclinas o cefalosporinas de primera generación se ha conseguido controlar, en parte, las infecciones causadas por este patógeno (Bauernfeind y col., 1987; Michel, 1988). Sin embargo, existen dos problemas relacionados con la profilaxis de larga duración: el primero es que existen datos que sugieren que los pacientes que reciben profilaxis antiestafilocócica se colonizan o desarrollan infección por otros microorganismos como *P. aeruginosa* o *H. influenzae* más rápidamente (Bauernfeind y col., 1987; Bauernfeind y col., 1988; Geddes, 1988); el segundo es que se han dado resistencias en *S. aureus* relacionadas con la profilaxis con cotrimoxazol a largo plazo. Uno de los mecanismos de resistencia que se conocen es debido a la inactivación del gen *thyA*, que codifica para la timidilato sintetasa. Por ello, este tipo de resistencia se ha observado en cepas dependientes de timidina, que tienen este gen inactivado, y que presentan una morfología anómala, normalmente se trata de colonias pequeñas, resistentes a aminoglicósidos y que no crecen en medios habituales pudiendo pasar desapercibidas, son las *Small Colony Variants* (SCVs). En un estudio reciente se ha descrito incluso la selección de SCVs de *S. aureus* en coinfecciones con *P. aeruginosa* gracias a un exoproducto de *P. aeruginosa*, 4-hidroxi-2-heptilquinolina-N-óxido (HQNO) (Hoffman y col., 2006). También se ha observado que la terapia de mantenimiento con azitromicina en pacientes FQ conduce a la aparición de resistencia a macrólidos en prácticamente todos los portadores de *S. aureus*. La mejora de la función pulmonar tras el inicio de tratamiento con azitromicina parece ser temporal sin embargo esto no parece relacionado con la resistencia a los macrólidos de *S. aureus* (Phaff y col., 2006; Tramper-Stranders y col., 2007).

Por otra parte, los aislamientos de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) no son muy frecuentes en nuestro país, aunque están aumentando en Norte América. Aproximadamente en el 19% de los pacientes con FQ los *S. aureus* que se aíslan son SARM (Cystic Fibrosis Foundation 2006). El análisis de cepas de SARM obtenidas de secreciones respiratorias de pacientes FQ en el hospital Ramón y

Cajal a lo largo de un periodo de 12 años mostró una elevada prevalencia del clon ST228-SSCmecl, un clon multiresistente con capacidad de formar biofilms, sugiriendo que podía existir transmisión cruzada entre los pacientes o bien una fuente común de infección (Molina y col., 2008). Recientemente se ha descrito la aparición de casos de infecciones por clones de SARM comunitarios productores de Leucocidina Pantón Valentine (LPV) en la población FQ asociadas al desarrollo de infección pulmonar invasiva incluyendo abscesos pulmonares por lo que la identificación y el tratamiento tempranos de estos pacientes es crucial (Elizur y col., 2007). En general, la detección de SARM en FQ es un marcador para la aplicación de terapia más agresiva y puede reflejar una mayor gravedad de la enfermedad. En cuanto a la afectación de la función pulmonar, hasta el momento la detección eventual de SARM no se ha relacionado con un declive de la función pulmonar (Sawicki y col., 2008), sin embargo, la infección persistente por SARM sí se ha relacionado con un declive más rápido de la función pulmonar en pacientes FQ de edades comprendidas entre los 8 y los 21 años (Dasenbrook y col., 2008).

La virulencia de *S. aureus* se debe, sobre todo, a su capacidad de adherirse al epitelio del tracto respiratorio y de evitar la respuesta inmunitaria. En la adhesión al epitelio intervienen los ácidos teicoicos y la formación del *slime*, que es un complejo polisacárido de la pared bacteriana que facilita y mantiene la adherencia. Entre los factores que ayudan a *S. aureus* a evadirse de la respuesta inmune encontramos las leucocidinas, que lisan células fagocíticas, la cápsula polisacárida, que evita la respuesta mediada por el complemento y los anticuerpos y la proteína A, que es una potente endotoxina. Otros factores de virulencia son las hemolisinas, la hialuronidasa y la coagulasa (Cohen 1986).

***Pseudomonas aeruginosa***. En su morfotipo mucoso, se aísla en el 80% de los pacientes adolescentes y adultos, asociándose en más del 50% con una infección crónica. En este caso, el desarrollo de antimicrobianos antipseudomónicos ha contribuido a conseguir un efecto paliativo de las infecciones por *P. aeruginosa* en los pacientes FQ pero no a la erradicación completa del microorganismo. Por lo tanto, desde el punto de vista clínico, la adaptación de *P. aeruginosa* al entorno

pulmonar tiene consecuencias realmente negativas; una vez que llega y la infección crónica se establece la erradicación completa no es posible y por lo tanto los objetivos terapéuticos pasan de tratar de curar la infección a intentar reducir el declive de la función pulmonar y mejorar la calidad de vida del paciente (Gibson y col., 2003). La infección crónica por *P. aeruginosa* es la principal responsable del declive de la función pulmonar y, en último término, de la muerte de los pacientes FQ (Gibson y col., 2003; Govan y Deretic 1996).

Como ya se ha comentado anteriormente *P. aeruginosa* presenta una particular especificidad por el epitelio pulmonar. Debido a la alteración de CFTR, aumentan los asialo-gangliósidos-GM<sub>1</sub> en la zona apical de las células epiteliales del pulmón actuando como receptores específicos de los pili de *P. aeruginosa*. Además de esta mayor afinidad por el epitelio, este microorganismo produce numerosas toxinas y factores de virulencia que le facilitan la adaptación a las vías respiratorias y que se describen más adelante.

***Haemophilus influenzae***. Es la tercera bacteria más frecuentemente aislada en el tracto respiratorio de los pacientes FQ. Generalmente se trata de cepas de *H. influenzae* no tipificables (NTHi). Aproximadamente un 15% de los pacientes están colonizados o infectados por este microorganismo aislándose normalmente en niños, aunque se cree que en los adultos podría no detectarse debido a su enmascaramiento por las cepas mucosas de *P. aeruginosa* (Miller y Gilligan 2003). La colonización por *H. influenzae* es un proceso dinámico aunque existen trabajos que sugieren la presencia de clones que se adaptarían mejor al entorno y podrían permanecer durante largos periodos en el tracto respiratorio de estos pacientes (Román y col., 2004). El papel que juega este microorganismo en la inflamación y la infección crónica en la FQ no está claramente demostrado (Gibson y col., 2003) aunque se ha encontrado relación con las exacerbaciones de las infecciones pulmonares durante el periodo de colonización (Cantón y col., 1998). Recientemente se ha demostrado, también, que este microorganismo forma biofilms en la superficie apical de las células epiteliales de las vías respiratorias disminuyendo la susceptibilidad a los antibióticos y provocando la respuesta

inflamatoria e inmunológica del huésped (Starner y col., 2006). Esto ayudaría a entender mejor la patogénesis inicial de la enfermedad pulmonar en la FQ y a valorar la importancia del tratamiento temprano de la colonización por *H. influenzae* en los pacientes FQ. Se ha demostrado que concentraciones subinhibitorias de azitromicina tienen propiedades antibiofilm incluso en las cepas de NTHi más resistentes a este antibiótico (Starner y col., 2008) pero, al igual que en *S. aureus*, también se ha observado un aumento de la resistencia a macrólidos en pacientes con terapias mantenidas con azitromicina (Phaff y col., 2006).

***Burkholderia cepacia***. *B. cepacia* se describió por primera vez como patógeno en pacientes con FQ en 1984. Posteriormente se ha visto que esta especie incluye 9 genomovares que forman el complejo *B. cepacia*. Los genomovares que más frecuentemente se aíslan en los pacientes FQ son el genomovar II (*B. multivorans*) y III (*B. cenocepacia*) que constituyen el 85% de los aislados del complejo *B. cepacia*. La infección por este microorganismo está relacionada con altos índices de morbilidad y mortalidad. Alrededor de un 20% de los pacientes colonizados con esta bacteria desarrollan el “síndrome cepacia”, principalmente causado por *B. cenocepacia* (genomovar III). Estos pacientes desarrollan neumonía necrotizante con un rápido declive de la función pulmonar, bacteriemia, que no suele producirse con otros microorganismos en la FQ, y finalmente la muerte por fallo pulmonar. Además el complejo *B. cepacia* presenta resistencia a casi todos los antimicrobianos (Gibson y col., 2003; Govan y Deretic 1996; Miller y Gilligan 2003).

Un aspecto importante en las colonizaciones e infecciones producidas por *B. cepacia* es la transmisión de persona a persona, por lo que los pacientes colonizados por esta bacteria deben ser controlados y evitar el contacto con otros pacientes FQ.

Los factores de virulencia no se conocen con profundidad aunque se han descrito cepas mucosas, de hecho, recientemente se ha visto que las 9 especies del complejo *B. cepacia* son capaces de expresar el fenotipo mucoso así como de revertirlo en pacientes con infección crónica (Zlosnik y col., 2008). Se han

caracterizado algunos exoproductos como proteasa, hemolisina y fosfolipasa que pueden participar en la patogénesis. También se han relacionado los sistemas de secreción de tipo III y IV con la patogenia de *B. cepacia* (Sajjan y col., 2008; Tomich y col., 2003). Además poseen flagelos y pilis que participan en la adhesión al epitelio pulmonar y presentan afinidad por los receptores asialo-gangliósido GM<sub>1</sub>. Su habilidad para establecer infecciones crónicas, muchas veces fatales, parece estar relacionada con la expresión de factores de virulencia regulados por el *Quorum-Sensing* (QS). En un trabajo reciente (Savoia y col., 2007) se ha visto que tanto la formación de biofilm como la capacidad de penetrar y replicarse dentro de los macrófagos confieren protección a estos microorganismos frente a los antimicrobianos, lo que ayudaría a entender los frecuentes fracasos del tratamiento antibiótico en los pacientes FQ.

***Stenotrophomonas maltophilia***. Se relacionó con la FQ en la década de los 70. Su prevalencia es mayor en Europa (10-30%) que en EEUU (4%) probablemente debido a la mayor utilización de determinados antibióticos, y cada vez se observa con más frecuencia. Presenta un patrón de multirresistencia, excepto al cotrimoxazol, y sus factores de patogenicidad no son bien conocidos aunque se sabe que es capaz de producir numerosas enzimas (proteasas, elastasas, Dnasas, Rnasas, lipasas, etc.) e incluso un fenotipo mucoso, aunque su papel en la enfermedad pulmonar no se ha determinado (Miller y Gilligan 2003). Recientemente se han descrito varios casos de pacientes FQ colonizados por *S. maltophilia* con fenotipo SCV sugiriendo que la exposición prolongada a cotrimoxazol puede seleccionar este fenotipo además de la consiguiente resistencia a cotrimoxazol (Anderson y col., 2007).

Otros bacilos gram-negativos no fermentadores que en ocasiones se aíslan en pacientes FQ y que cada vez son más comunes son ***Achromobacter xylosoxidans*** y ***Acinetobacter*** que se asocian a pacientes multitratados con antimicrobianos y a la colonización de pacientes sometidos a trasplante pulmonar (Cantón y col., 1998); u otros, como ya se ha comentado anteriormente como

***Inquilinus limosus***, ciertas especies de ***Ralstonia*** o aquellos que pertenecen al nuevo género ***Pandoraea*** (Davies y col., 2007). Su papel en la afectación pulmonar tampoco se conoce bien.

***Streptococcus pneumoniae***. Se aísla ocasionalmente sobre todo en etapas iniciales de la enfermedad y participa esporádicamente en las exacerbaciones. Es capaz de adherirse a la superficie mucosa y de elaborar productos extracelulares que estimulan la secreción mucosa y contribuyen a una peor evolución de las exacerbaciones (Cantón y col., 1998). Se ha observado la persistencia de clones idénticos con niveles elevados de resistencia a antibióticos en pacientes FQ durante periodos prolongados así como la capacidad de crecimiento en forma de biofilm que se da más frecuentemente en estos aislados FQ de *S. pneumoniae* (García-Castillo y col., 2007).

***Enterobacteriaceae***. Las enterobacterias se pueden encontrar en el 1-4% de los pacientes con FQ y en el 10% de los casos de exacerbaciones agudas. La colonización por enterobacterias es más frecuente en niños de 0 a 5 años generalmente antes de que se produzca la colonización crónica por *P. aeruginosa* y suele ser transitoria. Las enterobacterias más frecuentemente aisladas son *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. o *Proteus* spp. Aunque no es muy frecuente, las enterobacterias pueden producir infecciones crónicas en los pacientes con FQ, desarrollando fenotipos altamente mucoides, similares a los de *P. aeruginosa* y asociándose con el desarrollo de multirresistencia antibiótica.

***Levaduras y Aspergillus spp.*** Los hongos levaduriformes y filamentosos se aíslan con frecuencia en las muestras pulmonares de los pacientes FQ siendo *Aspergillus* sp y *Candida* sp las especies más frecuentes. Sin embargo, solo *Aspergillus* sp se ha relacionado con síntomas pulmonares provocando Aspergilosis Broncopulmonar Alérgica. Este hongo, sobre todo *A. fumigatus*, se aísla en más del 25% de los pacientes FQ. Otro hongo filamentoso aislado comúnmente es *Scedosporium apiospermum*, cuya significancia se desconoce

(Gibson y col., 2003).

**Infecciones virales.** El 20% de las exacerbaciones pulmonares en los pacientes FQ son debidas a virus, principalmente adenovirus, virus influenzae y virus respiratorio sincitial y son más frecuentes en niños que en los adultos, donde la incidencia es bastante baja (Cantón y col., 1998, Clifton y col., 2007). Son infecciones agudas que causan un daño importante sobre el epitelio respiratorio deteriorando la función pulmonar y favoreciendo las infecciones bacterianas (Miller y Gilligan 2003).

**Micobacterias.** Las infecciones por *Mycobacterium tuberculosis* son infrecuentes en los pacientes FQ, sin embargo la incidencia de infecciones causadas por micobacterias no tuberculosas es relativamente frecuente en estos pacientes. Se aíslan en un 20 % de los pacientes FQ y su incidencia aumenta con la edad. Las más frecuentemente aisladas son las de crecimiento rápido, *M. chelonae* y *M. fortuitum* y las micobacterias del complejo avium (Miller y Gilligan 2003).

## 2 *Pseudomonas aeruginosa*

### 2.1 Características generales

**Aspectos microbiológicos.** *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram-negativo que mide entre 1,5 y 5 µm de longitud y de 0,5 a 1 µm de anchura, recto o ligeramente curvado y no formador de esporas. Es un microorganismo móvil debido a la presencia de un flagelo polar (Holt y col., 1994).

Tiene un metabolismo aerobio estricto aunque puede utilizar nitratos como aceptor de electrones en condiciones de anaerobiosis. Es oxidasa positivo, catalasa positivo y crece en el medio de agar MacConkey en forma de colonias no fermentadoras de lactosa. La temperatura óptima de crecimiento es de 37° C, pero también puede crecer a 42° C, característica que la diferencia de las otras especies del género, excepto de *P. mendocina*, *P. luteola* y *P. pseudoalcaligenes* que igualmente pueden crecer a esta temperatura. Algunas cepas de *P. aeruginosa* presentan cierto crecimiento a 4° C. Las colonias de *P. aeruginosa* son característicamente aplanadas, extensas, con bordes serrados y aromáticas, de olor descrito como dulce-jabonoso (Kiska y col., 2003).

*P. aeruginosa*, así como las otras especies del grupo fluorescente (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. montelii*), tienen la particularidad de producir pigmentos, principalmente pioverdina, que es un pigmento verde-amarillo soluble en agua que emite fluorescencia cuando se ilumina con luz UV. Algunas cepas de *P. aeruginosa* son también capaces de producir otros pigmentos como la piocianina (que junto con la pioverdina produce el color verde-azulado brillante propio de la especie), piorubina (color rojizo) o piomelanina (marrón o marrón oscuro). Hay, sin embargo, cepas que no producen ningún pigmento, y éstas suelen corresponder con las aisladas de enfermos de FQ.

**Hábitats naturales.** Se trata de un microorganismo ubicuo, que es capaz de colonizar/infectar una amplia variedad de nichos ecológicos incluyendo hábitats

acuáticos, suelos, animales y plantas gracias a su impresionante versatilidad y plasticidad metabólica. Gracias a su gran genoma (6,3 Mpb), *P. aeruginosa* contiene una gran proporción de genes implicados en la regulación (más del 9,4%), hecho que se produce en microorganismos capaces de sobrevivir en diversos ambientes (Stover y col., 2000).

Presenta predilección por los ambientes húmedos (Holt y col., 1994), por ello se encuentra con relativa frecuencia en desinfectantes, jabones, colirios y otros fluidos de uso hospitalario (Morrison y col., 1984), así como en sistemas de ventilación, duchas y equipos de terapia respiratoria. Esta característica hace que *P. aeruginosa* sea una causa frecuente de infección nosocomial.

También es usual encontrarla en duchas, piscinas, baños, soluciones de lentes de contacto, superficie de frutas y vegetales crudos, cosméticos, etc., constituyendo una causa relativamente frecuente de infección comunitaria (Bottone y col., 1993; Foca y col., 2000; Holland y col., 1993; Komshian y col., 1990; Pollack 2000).

Más raro es encontrar esta bacteria como parte de la microbiota normal. Sin embargo se ha aislado *P. aeruginosa* en el tubo digestivo de algunos individuos sanos y también aunque con menor frecuencia en orofaringe, mucosa nasal, axilas y perineo. En pacientes hospitalizados la tasa de colonización es mayor sobre todo cuando éstos han sido sometidos a tratamientos con antibióticos de amplio espectro y/o hospitalizados por largos períodos. En pacientes intubados la colonización también puede afectar a las vías respiratorias bajas (Mayhall 1997; Pollack 2000).

Resulta interesante el hecho de que la presencia de *P. aeruginosa* en diferentes ambientes no se debe, aparentemente, a la especialización de diversas líneas celulares de diferentes nichos ecológicos. Un ejemplo es el de los enfermos FQ, infectados frecuentemente por un clon que se ha encontrado, también con frecuencia, en ambientes acuáticos (Römling y col., 1994). Además los aislados tanto clínicos como ambientales de *P. aeruginosa* muestran propiedades patogénicas y biodegradativas independientemente de su origen (Alonso y col., 1999).

## 2.2 Importancia clínica

*P. aeruginosa* es, sin duda alguna, el patógeno humano más importante dentro de su género, ya sea tanto por la cuantía y el tipo de infecciones que ocasiona, como por la morbilidad y mortalidad de las mismas (Pollack 2000). Aunque generalmente no provoca infecciones en los adultos sanos, tiene una increíble habilidad para colonizar casi cualquier ambiente y esto, junto con su resistencia intrínseca a los antibióticos, hace que tenga una posición privilegiada a la hora de aprovechar una brecha en el sistema inmunitario. Es, por tanto, el principal agente causal de infecciones oportunistas en el ser humano (Stover y col., 2000).

Las infecciones producidas por este microorganismo van desde infecciones cutáneas superficiales hasta sepsis fulminantes. Entre las infecciones adquiridas en la comunidad debidas a esta bacteria, la foliculitis y la otitis externa (“oído de nadador”), son las más frecuentes y suelen cursar con escasa gravedad; ambas son características de individuos que practican deportes acuáticos en piscinas. La forma más grave de infección ótica por *P. aeruginosa* es la otitis externa maligna u otitis externa necrotizante. Esta forma de infección se describió originalmente en pacientes ancianos diabéticos, aunque en la actualidad los casos descritos incluyen también enfermos de SIDA y ancianos sin enfermedades de base como diabetes u otras inmunodeficiencias (Hern y col., 1996; Ress y col., 1997).

La infección ocular por *Pseudomonas aeruginosa*, resulta de la inoculación directa del microorganismo en el tejido dañado, circunstancia que se da frecuentemente en portadores de lentes de contacto vehiculando la bacteria a través de soluciones de limpieza contaminadas. La queratitis es la manifestación más frecuente (Baum y col., 1990; Wang y col., 1998) aunque existen muchas formas de infección, algunas de las cuales pueden ser extremadamente rápidas y devastadoras, conduciendo a la pérdida de visión como en el caso de la endoftalmitis (Eifrig y col., 2003).

De forma más anecdótica, podemos encontrar a *P. aeruginosa* como causa de Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC), principalmente en fumadores de mediana edad expuestos a aerosoles relacionados con dispositivos que puedan

ser reservorio de humedad y por tanto del microorganismo ( duchas, sistemas de humidificación, etc). La mortalidad de la NAC es bastante elevada (33%), ya que debido a lo poco habitual de la misma, raramente se escogen los tratamientos empíricos apropiados (Hatchette y col., 2000).

También es habitual la bacteriemia, asociada frecuentemente a endocarditis, en pacientes adictos a drogas por vía parenteral (Komshian y col., 1990).

Sin embargo, *P. aeruginosa*, es, sobre todo, una de las más frecuentes y graves causas de infección nosocomial asociada a una elevada mortalidad. Actualmente es una de las principales causas de infecciones nosocomiales agudas afectando especialmente a pacientes intubados en unidades de cuidados intensivos (UCI) con neumonía asociada a la ventilación mecánica (Ventilator Associated Pneumonia, VAP) y cuya mortalidad se sitúa entre el 40 o 50%, o a pacientes con infecciones de heridas quirúrgicas o quemados (Lynch 2001; Vincent 2003). Representa un serio problema en las unidades de cuidados intensivos debido, por un lado, a la gravedad de los pacientes alojados en dichas unidades, y por otro, a la ya mencionada facultad de esta bacteria de subsistir en los equipos de ventilación mecánica, superficies inertes, instrumental médico y cualquier solución de uso hospitalario. También se ha asociado a infecciones del tracto urinario, infecciones de herida, peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal y bacteriemia (Bernardini y col., 1987; Mousa 1997; Vincent 2003).

*P. aeruginosa* es, también, la principal causa de infecciones en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas como la Fibrosis Quística (FQ), que se describe con detalle más adelante, o las bronquiectasias. En las bronquiectasias, la infección crónica por *P. aeruginosa* se asocia con un severo deterioro de la función pulmonar, peor pronóstico y, por lo tanto, una peor calidad de vida. Respecto a la Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en la actualidad se está empezando a reconocer a este microorganismo como un marcador de inflamación importante de las vías aéreas en este tipo de pacientes (Hill y col., 2000). La prevalencia de *P. aeruginosa* en pacientes con EPOC es, aproximadamente, de un 4% aunque aumenta hasta un 8-13% en pacientes con obstrucción avanzada de las vías aéreas (Lieberman y Lieberman 2003).

## 2.3 Virulencia

A pesar de tratarse de un patógeno oportunista de origen ambiental, *P. aeruginosa* presenta gran cantidad, diversidad y complejidad de factores de virulencia que requiere para el establecimiento de las infecciones. Su enorme genoma, de más de 6,3 Mb, es altamente plástico en cuanto a la capacidad de incorporación y modificación del ADN, y contiene los genes que codifican para una amplia variedad de sistemas de virulencia bacteriana. Los determinantes de virulencia de *P. aeruginosa* se resumen en la Tabla 1.

### Determinantes de membrana

**Flagelo.** El flagelo de *P. aeruginosa* es uno de sus más relevantes factores de virulencia (Montie y col., 1982). Confiere a esta bacteria motilidad y quimiotaxis por determinados sustratos, propiedades que han demostrado ser importantes para el establecimiento inicial de las infecciones respiratorias en modelos de neumonía aguda en ratones (Feldman y col., 1998). Además, juega un papel importante en la formación del biofilm ayudando tanto en la adhesión inicial a la superficie como en la dispersión de este (O'Toole y col., 1998, Sauer y col., 2002). El flagelo actúa también como un potente inductor de la inflamación mediante la interacción de la flagelina con los receptores epiteliales *Toll-like* TLR-5 (Hayashi y col., 2001; Ramos y col., 2004). La síntesis del flagelo es muy compleja, interviniendo aproximadamente 50 genes en la regulación de la transcripción y la formación de la estructura que comprende toda la unidad flagelar, el cuerpo basal, estructuras circulares llamadas MS y anillos P, y un también complejo motor. En general, la motilidad es una propiedad clave en la virulencia de *P. aeruginosa*, sin embargo la capacidad de producir el flagelo se pierde en las cepas mucosas aisladas de pacientes con enfermedades pulmonares crónicas. De hecho, se ha visto que la expresión del flagelo y la hiperproducción de alginato están inversamente relacionadas y que el factor sigma alternativo AlgT, implicado en la producción de alginato, reprime la expresión del flagelo inhibiendo la expresión del principal regulador flagelar *flaQ* (Tart y col., 2005).

**Adhesinas.** *P. aeruginosa* produce dos tipos de adhesinas: las adhesinas pili y las adhesinas no pili. Las adhesinas pili están localizadas en un polo de la bacteria y sus receptores en las células hospedadoras parecen ser los asialogangliósidos- $G_{M1}$ . Las adhesinas pili de *P. aeruginosa* se caracterizan por adherir bien la bacteria a células epiteliales, pero no a las secreciones mucosas del hospedador. Las adhesinas pili, principalmente tipo IV, también intervienen en la motilidad tipo *twitching* de *P. aeruginosa*, factor importante en la formación de biofilms *in vitro* en superficies inertes (O'Toole y col., 1998), y en la evasión de los fagocitos del hospedador. La expresión del pili está regulada por diversos genes (*pilA*, *pilB*, *pilC*, etc.) y se activa por la escasez de nitrógeno en el medio (Gupta y col., 1994). Las adhesinas no pili median la adhesión de *P. aeruginosa* a las secreciones mucosas del hospedador siendo un factor de virulencia importante sobre todo en pacientes con FQ (Carnoy y col., 1994; Lyczak y col., 2000). Dentro de este grupo cabe destacar el lipopolisacárido (LPS).

**Lipopolisacárido (LPS).** Constituye un factor importante tanto en la mediación de la virulencia bacteriana como en la respuesta del huésped (Pier 2007). *P. aeruginosa* se adhiere a las células del epitelio pulmonar o del tejido corneal lesionado por medio de la unión de su LPS con el regulador de conductancia transmembrana (CFTR). La interacción LPS-CFTR es determinante para la internalización de la bacteria en el epitelio respiratorio y actúa, por tanto, como sistema de defensa de nuestro organismo pero en la FQ el epitelio del paciente al tener mutado el CFTR internaliza entre 10 y 50 veces menos *P. aeruginosa* que un epitelio con CFTR normal (Pier y col., 1996). Además, se ha encontrado que en las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de enfermos de FQ, la porción del Lípido A del LPS presenta alteraciones en su estructura que conducen a cambios en la respuesta inflamatoria promoviendo la patogénesis (Ernst y col., 1999).

**Tabla 1.** Principales determinantes de virulencia en *Pseudomonas aeruginosa*.

<b>Determinante de virulencia</b>	<b>Actividad</b>
<b>Determinantes de membrana</b>	
Flagelo	Motilidad y quimiotaxis
Adhesinas (pili tipo 4 )	Adhesión a células huésped, interacción con asialo-gangliósidos G <sub>M1</sub>
Lipopolisacárido	Adhesión a células huésped, interacción con TLR4 y CFTR
<b>Determinantes de secreción</b>	
Sistema de secreción Tipo III	
ExoS, ExoT	ADP-ribosiltransferasa, modulación de GTPasas, disrupción de los sistemas de transducción de señales de las células huésped
ExoU	Potente fosfolipasa citotóxica
ExoY	Adenilato ciclasa, causa la reorganización del citoesqueleto de actina
Exotoxina A	ADP-ribosilación del factor de elongación-2, inhibición síntesis de proteínas
Pioverdina	Sideróforo
Fenazinas (piocianina)	Actividad redox, amplio espectro de daño celular
Elastasas (LasA y LasB)	Proteasas que degradan elastina y otras proteínas
Ramnolípido	Solubilización surfactante alveolar, ciliostasis
Fosfolipasa C	Degradación del surfactante alveolar

El LPS de *P. aeruginosa* también juega un importante papel en la resistencia a la inmunidad innata del hospedador. La expresión de las cadenas largas O previene la lisis por parte del complemento (Pier y col., 1984) y esta estructura puede sufrir variaciones que afectan a la resistencia a los péptidos antimicrobianos (Conrad y col., 1989).

## **Determinantes de secreción**

**Sistema de secreción tipo III (ExoS, ExoU, ExoT y ExoY).** Está característicamente conservado en los patógenos bacterianos, incluyendo *P. aeruginosa* (Frithz-Lindsten y col., 1998, Galan y col., 1999). Este sistema permite la inoculación directa de las toxinas bacterianas en las células eucariotas preservándolas de la acción de los anticuerpos y causando alteraciones intracelulares mediante la inhibición del citoesqueleto de actina y la afectación de la síntesis proteica. En *P. aeruginosa* la expresión de las toxinas del sistema de secreción tipo III está asociada a una mala evolución clínica, incluyendo el aumento de mortalidad en pacientes con infección aguda. Se conocen cuatro proteínas efectoras principales: las exoenzimas ExoS, ExoU, ExoT y ExoY. Estas enzimas actúan reduciendo la efectividad de la defensa fagocítica del hospedador. ExoS y ExoT son tóxicas para los fagocitos polimorfonucleares (PMNs), y ExoU lo es para los macrófagos.

ExoS y ExoT poseen un 76% de identidad en su secuencia aminoacídica, y aunque no comparten exactamente los mismos sustratos, sus papel en las células del hospedador es similar (Sun y col., 2003). Actúan como ADP-ribosiltransferasas y GTPasas moduladoras siendo capaces de activar a ciertas proteínas citoplasmáticas que intervienen en los procesos de transducción de señal, mediante su extremo N-terminal, e inactivar a otras proteínas con esta misma función celular mediante su extremo C-terminal, dando como resultado un “cortocircuito” en los mecanismos de transducción de señal (Barbieri y col., 2004) y dando lugar a una hiperproducción de citocinas en las células productoras de estas proteínas pro-inflamatorias debido, precisamente, al bloqueo de los

procesos celulares de transducción de señal que son los que controlan la producción de citokinas pro-inflamatorias (Coburn y col., 1999; Lee y col., 2005).

ExoU es una potente fosfolipasa citotóxica con actividad fosfolipasa A<sub>2</sub>-like (Phillips y col., 2003; Sato y col., 2003), capaz de lisar una gran variedad de células diana (Finck-Barbancon y col., 1997). Entre un 20 y un 30% de las cepas de *P. aeruginosa* producen ExoU, la mayoría aisladas de infecciones oculares y neumonía aguda siendo, por tanto, importante para el desarrollo de la infección invasiva aguda (Wareham y col., 2007). Curiosamente, los aislados procedentes de enfermos de FQ raramente son productores de ExoU (Rosenfeld y col., 2003). ExoU representa un marcador de virulencia en cepas clínicas (Schulert y col., 2003), modula la expresión genética en las células del epitelio respiratorio (McMorran y col., 2003) e incrementa la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplasmático conduciendo a la activación de los canales de Ca en las membranas de las células epiteliales (Jacob y col., 2002).

Finalmente, ExoY es una adenilato ciclasa que provoca la reorganización del citoesqueleto de actina (Yahr y col., 1998).

**Exotoxina A.** Se trata de otra toxina muy importante en *P. aeruginosa* aunque ésta no se secreta mediante el sistema de secreción tipo III, sino que es directamente liberada por la bacteria al medio extracelular (sistema de secreción tipo II). La exotoxina A, ocasiona la ADP-ribosilación del factor de elongación 2, vital en la síntesis proteica, causando así el bloqueo de ésta, lo que conlleva un daño tisular en el hospedador unido a la disminución de la actividad de los fagocitos del mismo. La expresión de la exotoxina A está regulada por los niveles de hierro (Kounnas y col., 1992; Wieland y col., 2002) y está modulada, por tanto, por el sideróforo **pioverdina**, que es también esencial para la virulencia (Meyer y col., 1996).

**Elastasas (Las A y LasB).** *P. aeruginosa* produce una variedad de proteasas que pueden inactivar a los factores inmunitarios del hospedador, que son citotóxicas y que pueden degradar los componentes tisulares, permitiendo el avance del

microorganismo en el proceso infeccioso. Las proteasas más estudiadas en *P. aeruginosa* son las proteasas con actividad elastolítica en las células pulmonares: LasA y LasB. LasB es una zinc-metaloproteasa y LasA una serín proteasa que se une a la elastina y aunque no la degrada directamente, sí potencia la actividad elastolítica de LasB. La actividad de estas dos enzimas es más importante para la bacteria en el estadio inicial de la infección pulmonar, en el que degradan anticuerpos, componentes del complemento y al inhibidor de proteasas  $\alpha_1$ . La producción de LasA y LasB está influida por la concentración extracelular de zinc y hierro y controlada por diversos genes entre los que destaca el activador transcripcional LasR que también interviene en la regulación de la expresión de otros genes mediante sistemas sensores dependientes de densidad de población [sistemas *quorum-sensing* (QS)], de los que se hablará más adelante (Gambello y col., 1991; Storey y col., 1998; Toder y col., 1991; Toder y col., 1994). Se ha observado, también, que un aumento en los niveles de Ca puede inducir determinados factores de virulencia que afectan a la estructura y composición de la matriz extracelular en la formación de los biofilms, como algunas proteasas extracelulares, entre ellas LasB (Sarkisova y col., 2005).

**Hemolisinas.** La proteasa alcalina **fosfolipasa C** (Plc) y el **ramnolípido** (Rhl) son, como la exotoxina A, factores extracelulares. Ambos son capaces de causar daño en los pulmones de los pacientes con FQ. Actúan sinérgicamente a nivel de los alvéolos pulmonares, solubilizando los fosfolípidos del surfactante pulmonar (Rhl) e hidrolizándolos posteriormente (Plc), causando así el colapso de los alvéolos; hecho que explica la creciente pérdida de función respiratoria en los pacientes con FQ (Soberon-Chávez 2005; Wieland y col., 2002). En un trabajo reciente también se ha observado que la rápida necrosis que sufren los PMN es debida a la producción de ramnolípido, regulada por el sistema QS que se describe a continuación (Jensen y col., 2007).

**Fenazinas (piocianina).** Estos compuestos atraviesan membranas biológicas y causan un amplio espectro de daños en el epitelio pulmonar, alteran la producción

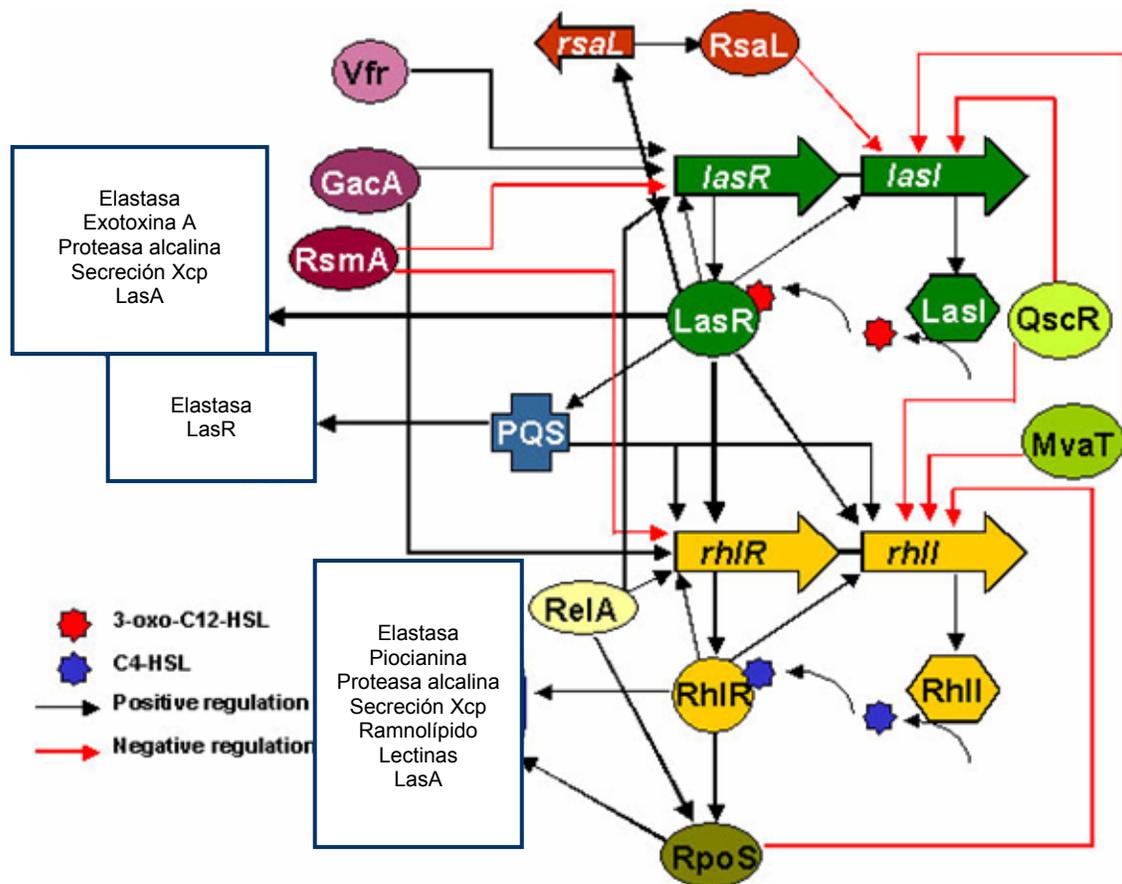
de citokinas y modulan las señales celulares (Lau y col., 2004). Al igual que LasB, parece ser que un incremento de los niveles de Ca induce de tres a cinco veces la producción de piocianina (Sarkisova y col., 2005).

A parte de estos factores de virulencia existen otros sistemas y mecanismos que tienen papeles muy importantes en la patogenicidad de la bacteria:

**Fenotipo mucoide.** Se trata del fenotipo hiperproductor de alginato que dificulta el aclaramiento de la bacteria y que se describe más adelante (apartado 3.3).

**Sistema sensor de densidad de población, *Quorum sensing* (QS).** Se trata de un sistema de regulación global que controla la expresión de numerosos genes y fenotipos, y que está gobernado por la secreción y detección de determinadas moléculas. Cuando se alcanza una densidad crítica de población bacteriana, son sintetizados y secretados en gran cantidad mediadores de bajo peso molecular, llegando al umbral de concentración que les permite unirse a sus proteínas diana. Estos mediadores moleculares del QS se denominan autoinductores debido a sus efectos auto-reguladores en las respuestas bacterianas a los estímulos del ambiente. El complejo autoinductor-proteína es entonces capaz de activar la expresión del gen que controla (Fuqua y col., 1996) mediando en la transcripción genética y en la producción de genes controlados por el QS. Esto permite, por ejemplo, que una población bacteriana sea capaz de expresar simultáneamente un fenotipo específico. Se ha demostrado que el QS controla la expresión de entre un 3 y un 10% del genoma de *P. aeruginosa* (Hentzer y col., 2003; Schuster y col., 2003; Wagner y col., 2003) y muchos de estos genes están implicados en su patogenicidad o bien juegan un papel importante en la persistencia durante la infección, principalmente contribuyendo a la formación del biofilm.

En *P. aeruginosa* los principales sistemas interrelacionados mejor conocidos del QS son los sistemas jerárquicos Las y Rhl (Figura 4). El primer sistema, Las, codifica las proteínas LasI y LasR. La proteína LasI cataliza la producción del autoinductor 3OC<sub>12</sub>-HSL [*N*-(3-oxodecanoil)-L-homoserina lactona] que se unirá,



**Figura 4.** Esquema del sistema *Quorum Sensing* (figura modificada de Potvin y col., 2008).

una vez alcanzado el umbral de concentración necesario, a su diana, el activador transcripcional LasR. Además de su papel como autoinductor, se ha atribuido a 3OC<sub>12</sub>-HSL la capacidad de inducir inflamación durante el proceso de infección (Smith y col., 2002). El complejo LasR-LasI controla la expresión de un grupo de diversos genes relacionados con factores de virulencia extracelulares de *P. aeruginosa* como *lasB*, *lasA*, *aprA*, *toxA* y al propio *lasI* y también actúa sobre el segundo sistema de QS RhIR-RhII. Es, a su vez, muy importante la implicación de este sistema en la maduración del biofilm, de hecho mutantes nulos en *lasI* son capaces de adherirse a la superficie pero no de formar biofilms verdaderos (Davies y col., 1998). También se activa por el sistema *las* la síntesis de pioverdina (Gambello y col., 1991; Gambello y col., 1993, Passador y col., 1993; Pearson y col., 1994; Pesci y col., 1997; Whiteley y col., 1999).

En el sistema Rhl, RhII cataliza la síntesis del autoinductor C<sub>4</sub>-HSL (*N*-butiril-L-homoserina lactona) que se une a su diana RhIR para activar la expresión de genes relacionados con la síntesis del ramnolípido y con la producción de piocinanina entre otros (Ochsner y col., 1994; Ochsner y col., 1995; Pearson y col., 1995; Pearson y col., 1997; Pearson y col., 1999; Pesci y col., 1997; Pessi y Haas, 2000; Whiteley y col., 1999; Winzer y col., 2000; Winson y col., 1995).

Existe una tercera molécula implicada en la comunicación intercelular mediada por ambos sistemas de QS, la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, conocida como *Pseudomonas quinolone signal* (PQS). Pertenece a la familia química de las 4-quinolonas, metabolitos secundarios con potente actividad antibiótica y controla la expresión de RhII y RhIR. La identificación de PQS establece un vínculo más entre los sistemas Las y Rhl y demuestra que las señales entre células no están restringidas a las acil-homoserina lactonas (Pesci y col., 1999).

**Genes *house keeping*.** Finalmente, muchos de los genes involucrados en la virulencia de *P. aeruginosa* son genes *house keeping*, que están relacionados con funciones celulares habituales y no con los clásicos genes de virulencia como los que codifican para las toxinas. Los genes *house keeping* (p.ej. *dsbA*, *mdoH*, *gacS* y *gacA*) están muy conservados, son imprescindibles para la supervivencia de la bacteria en el hospedador y tan fundamentales en la patogenicidad de *P. aeruginosa* como los genes de los factores de virulencia que se han descrito (Salyers y col., 2002).

**Islas de patogenicidad.** Además, algunas cepas de *P. aeruginosa* pueden contener islas genómicas adicionales, adquiridas por transferencia genética horizontal, representando un 10%, o incluso más, del genoma (Spencer y col., 2003), que pueden incluir islas de patogenicidad incrementando todavía más su potencial de virulencia, como por ejemplo PAPI-1 y PAPI-2 descritas en la cepa hipervirulenta PA14 (He y col., 2004).

## 2.4 Resistencia a los antibióticos

*P. aeruginosa* ha sido considerada siempre un objetivo difícil a la hora de aplicar una terapia antimicrobiana. Esto es debido al enorme potencial de resistencia antimicrobiana que presenta. Ya se ha comentado el gran tamaño de su genoma, así como su versatilidad y por tanto, capacidad de adaptación (Stover y col., 2000). El 0,3% del total de sus genes codifican para proteínas implicadas en la resistencia antibiótica. Además, dada la gran flexibilidad de su genoma, un 10% de los genes están organizados en islas de patogenicidad que contienen genes variables que codifican para factores de virulencia, y que tiene la habilidad de adquirir fácilmente elementos genéticos móviles grandes (integrones) que codifican para genes de resistencia (Kipnis y col., 2006; Normark y col., 2002; Woods, 2004). En este sentido, se han realizado diversos estudios de resistoma en *P. aeruginosa*, con el fin de analizar de forma global cuáles son los genes implicados en la resistencia. En general, estos estudios demuestran que tanto en la resistencia intrínseca como en la aparición de nuevas resistencias adaptativas, se encuentra implicada una compleja red de elementos que incluye numerosos genes no relacionados antes con la resistencia antimicrobiana y para los que todavía no se conoce su relevancia clínica (Breidenstein y col., 2008; Fajardo y col., 2008; Schurek y col., 2008).

Se trata, por tanto, de una bacteria que, de forma natural, presenta un cierto nivel de resistencia intrínseca a los antibióticos. Este hecho se debe a la producción constitutiva de una  $\beta$ -lactamasa cromosómica inducible, no inhibible por ácido clavulánico (cefalosporinasa del grupo AmpC) que le confiere resistencia intrínseca a amoxicilina, con o sin ácido clavulánico, y a las cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación con la excepción de la ceftazidima (Lodge y col., 1990). Algunos  $\beta$ -lactámicos, como cefalotina y ampicilina, además de ser hidrolizables por la AmpC, son capaces de inducirla (Livermore 1995), al contrario de lo que sucede con las carboxi- y ureido-penicilinas, como la ya mencionada ceftazidima, las cefalosporinas de cuarta generación (cefepime) y los monobactámicos (aztreonam), que a pesar de ser buenos sustratos para esta  $\beta$ -

lactamasa, conservan su actividad pues no inducen su expresión. Los carbapenems son estables a la hidrólisis por la cefalosporinasa cromosómica y por tanto son activos frente a *P. aeruginosa* a pesar de ser buenos inductores de la  $\beta$ -lactamasa. Otra razón que explica la resistencia natural de *P. aeruginosa* a ciertos antibióticos son las bombas de flujo, que expulsan de la célula algunos  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos, novobiocina, sulfamidas, tetraciclina y trimetoprim. Son en realidad estas bombas de expulsión las responsables de la teórica “impermeabilidad” de la membrana externa de *P. aeruginosa* que se le atribuyó durante mucho tiempo debido a la reducida entrada de los antibióticos en la célula. Sin embargo, la membrana externa de *P. aeruginosa* es muy rica en porina OprF, hecho que, en condiciones normales, (es decir, sin alteración de tamaño, número o conformación) la convierte en una estructura bastante permeable. Por lo tanto la causa de dicha “impermeabilidad” no es otra que la expulsión activa de los antibióticos antes mencionados, principalmente mediante el sistema de expulsión MexAB-OprM (Poole 2001).

Existen dos mecanismos mediante los cuales las bacterias, y por tanto también *P. aeruginosa*, pueden hacerse resistentes a los antibióticos: la adquisición de determinantes de resistencia por transferencia horizontal y la mutación en genes cromosómicos (Livermore 2002) cuya alteración, bien sea por modificación de la proteína que codifican, por su pérdida de expresión o precisamente lo contrario (hiperexpresión), confiere el fenotipo de resistencia. En la Tabla 2 se resumen los principales mecanismos de resistencia a los antipseudomonales en general. Sin embargo, la resistencia en las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ se debe principalmente a mutaciones en genes propios de la bacteria y no a la adquisición de genes exógenos.

### 2.4.1 Principales mecanismos de resistencia

**$\beta$ -lactámicos.** El mecanismo más relevante en cuanto al desarrollo de resistencias a penicilinas antipseudomonales (ticarcilina o piperacilina) y cefalosporinas (ceftazidima o cefepime) es la selección de mutaciones en el sistema de regulación de la cefalosporinasa cromosómica AmpC que conducen a la hiperproducción de la misma. Los niveles basales de esta  $\beta$ -lactamasa son bajos pero su expresión es inducible por ciertos  $\beta$ -lactámicos, especialmente cefoxitina e imipenem. Recientemente se ha demostrado que la expresión de *ampC* está regulada por un sofisticado sistema de represión-desrepresión formado por tres homólogos de *ampD* responsables de un mecanismo de regulación gradual de la producción de *ampC* (Juan y col., 2006). La hiperexpresión de bombas de expulsión activa, aunque en menor medida, también produce resistencia a estos  $\beta$ -lactámicos (Giwercman y col., 1990).

En lo que respecta a los carbapenems, los mecanismos de resistencia son diferentes dependiendo de si se trata de imipenem o meropenem. La resistencia a imipenem se produce mediante mutaciones que conllevan la pérdida de expresión de una proteína de membrana, la porina OprD, la cual es sólo permeable a los carbapenems y no a otros  $\beta$ -lactámicos; la pérdida de esta porina también produce sensibilidad reducida a meropenem. Sin embargo, para que *P. aeruginosa* adquiera resistencia clínica a meropenem necesita de la combinación de la pérdida de OprD junto a otro(s) mecanismo(s), como la sobreexpresión de MexAB-OprM o la hiperproducción de AmpC, o de la asociación de estos dos últimos mecanismos.

Por otra parte, ya se ha comentado, que en ocasiones la resistencia puede estar mediada por la adquisición de determinantes de resistencia, como sería el caso de las  $\beta$ -lactamasas transferibles. Las  $\beta$ -lactamasas adquiridas por vía horizontal detectadas con mayor frecuencia en *P. aeruginosa* son PSE-1 y PSE-4, que hidrolizan preferentemente penicilinas. Sin embargo, comienzan a ser igualmente importantes otras  $\beta$ -lactamasas que están emergiendo con fuerza en la actualidad y que confieren un espectro más amplio de resistencia como PER-1, OXAs de

espectro extendido, y las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBLs). PER-1 es una  $\beta$ -lactamasa de clase A, que confiere resistencia de alto nivel a ceftazidima, pero se inhibe por el ácido clavulánico. Se ha aislado con frecuencia en Turquía (Vahaboglu y col., 1997). Las OXAs de espectro extendido consiguen amplificar enormemente su espectro de hidrólisis, mediante pequeños cambios estructurales que les otorgan resistencia a ceftazidima, cefepime, cefpiroma, monobactamas y penicilinas, aunque no a los carbapenems. Al igual que la PER-1, también es habitual su detección en Turquía (Naas y col., 1999; Poirel y col., 2001). Finalmente, las MBLs son  $\beta$ -lactamasas inhibibles por EDTA (Livermore y col., 2000) que hidrolizan penicilinas, cefalosporinas y carbapenems (son carbapenemasas) pero no al aztreonam. Existen dos grupos mayoritarios de MBLs, IMP y VIM. Tras la aparición de la primera MBL (IMP-1) en Japón (Senda y col., 1996), se han descrito numerosas carbapenemasas estrechamente relacionadas en diferentes áreas geográficas y en otras especies (Gibb y col., 2002). Así pues, a la VIM-1, localizada por primera vez en Verona (Italia) le siguieron la VIM-2 y VIM-3 detectadas en distintos países (Francia, Grecia, España, Corea del Sur o Taiwan) (Livermore y col., 2000). Hasta el momento se han descrito más de 25 variantes de IMPs y 14 de VIMs. Recientemente se ha descrito una nueva carbapenemasa, la VIM-13, detectada en hospitales de Mallorca, así como la aparición, por primera vez en España, de la VIM-1 en *P. aeruginosa* (Juan y col., 2008).

Los genes de estas  $\beta$ -lactamasas (VIM, IMP y OXAs de espectro extendido) se encuentran como casetes dentro de integrones y están controlados por un promotor común. Esta circunstancia propicia los fenómenos de multirresistencia. La aparición de multirresistencias asociadas a integrones localizados en plásmidos es menos predecible aún que la resistencia mutacional, ya que la primera está condicionada por el proceso aleatorio de escape de genes a ADN móvil y transferible horizontalmente. A pesar de esta limitación, una vez constituidos los nuevos determinantes de resistencia, ya no es difícil que la cepa que los contenga se disemine entre pacientes, o que el elemento de resistencia se transfiera entre cepas, incluso de distintas especies. Aquí estriba la importancia de regular el empleo de antibióticos de amplio espectro y de contemplar al máximo las medidas

de control encaminadas a evitar la diseminación de la infección entre pacientes (Livermore 2002).

**Quinolonas.** La resistencia a quinolonas como norfloxacino o ciprofloxacino, se produce como consecuencia de mutaciones en su diana de acción, las topoisomerasas tipo II (ADN girasa, genes *gyrA* y *gyrB*) y tipo IV (genes *parC* y *parE*), siendo la más frecuente la que afecta a los codones 83 y 87 de la ADN girasa (en concreto en el gen *gyrA*). Las quinolonas también se ven afectadas por mutaciones que conducen a la hiperexpresión de bombas de expulsión, especialmente en los genes *nfxB* y *nfxC* (*mexT*) que regulan la expresión de las bombas MexCD-OprJ y MexEF-OprN respectivamente (Jalal y col., 2000). Hasta el momento, no se han descrito mecanismos de resistencia transferible a quinolonas en *P. aeruginosa*.

**Aminoglucósidos.** El mecanismo mayoritario de resistencia a aminoglucósidos en *Pseudomonas* y en todas las bacterias suele ser la adquisición de genes que codifican para enzimas modificantes de aminoglucósidos (Hurley y col., 1995), pero en las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ la resistencia a estos antibióticos se debe fundamentalmente a mutaciones que producen la hiperexpresión de bombas de expulsión activa (MexXY-OprM). Otro mecanismo de resistencia que sólo afectaría a los aminoglucósidos y no a otros antimicrobianos, consiste en la pérdida de permeabilidad debida a mutaciones en el sistema de transporte activo para estos antibióticos, situación que se da con frecuencia en cepas con fenotipo SCV (Mayer, 1986).

**Fosfomicina.** En las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ la resistencia a fosfomicina, a pesar de no estar tan bien estudiada como en otros antibióticos, parece producirse por mutaciones en los genes que codifican para las proteínas que transportan dicho antibiótico al interior de la célula, como los sistemas de transporte de hexosas-fosfato GlpT y UhpT u otros genes cromosómicos, y no la adquisición de la enzima inactivante de fosfomicina, la

glutathion-S-transferasa, codificada por los genes plasmídicos *fosA* y *fosB* frecuentes en otras especies (O'Hara, 1993).

**Colistina.** Ciertas cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes FQ presentan alterado el Lípido A del LPS. Se ha observado que estas alteraciones, además de incrementar la respuesta inflamatoria, confieren resistencia a las polimixinas (Ernst y col., 1999). Sin embargo, en la última década, polimixinas, como la colistina, han resurgido como una buena opción terapéutica para el tratamiento de las infecciones causadas por patógenos multiresistentes como *P. aeruginosa*. Esto es debido a la potente actividad bactericida y a la baja frecuencia en el desarrollo de resistencias que presenta este grupo de antimicrobianos.

**Tabla 2.** Principales mecanismos de resistencia a los antimicrobianos empleados para el tratamiento de la infección por *P. aeruginosa*.

	Mecanismos de resistencia																	
	Alteraciones de permeabilidad						Enzimas inactivantes de antibióticos										Modificación de la diana	
	Bombas de expulsión activa						β-lactamasas				Enzimas modificantes de aminoglucósidos							
	Pérdida oprD	MexAB	MexCD	MexEF	MexXY	MexGH	MexVW	Hiperexpresión cefalosporinasa	Penicilinas	BLEE	Metallo β-lactamasas	AAC (3)-I	AAC (3)-II	AAC (6')-I	AAC (6')-II	ANT (2')-I	Mutaciones en topoisomerasas	Metilación ribosomal
<b>Antibióticos</b>																		
<b>β-lactámicos</b>																		
Penicilinas		+	+/-		+/-			++	++	++	++							
Ceftazidima		+						++		++	++							
Cefepime		+	+		+			+		++	++							
Aztreonam		+	+					++		++								
Imipenem	++																	
Meropenem	+	+																
<b>Aminoglucósidos</b>																		
<b>Fluoroquinolonas</b>		+	+	+	+	+	+											+

GEN, gentamicina; NET, netilmicina; TOB, tobramicina; AMK, amikacina

### **3 Infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* en los pacientes FQ**

Las cepas de *P. aeruginosa* que causan infección aguda o crónica son inicialmente similares (o más probablemente indistinguibles) en términos de propiedades morfológicas, fisiológicas o patogénicas, dado su origen medioambiental común. Sin embargo, el establecimiento de la infección crónica está mediado por un complejo proceso adaptativo que incluye cambios fisiológicos, principalmente representados por la transición en el crecimiento de forma planctónica a biofilm (Costerton y col., 1999), así como la selección de numerosas mutaciones adaptativas que se requieren para la persistencia a largo plazo (Smith y col., 2006). La selección de estas mutaciones adaptativas se cree que está favorecida por la alta prevalencia de cepas hipermutadoras en las infecciones crónicas en contraste con lo que se observa en las infecciones agudas. Este proceso evolutivo puede llevar consigo otras consecuencias a nivel de la virulencia, persistencia (adaptación) y resistencia antimicrobiana.

Como ya se ha comentado, *P. aeruginosa* posee un genoma grande con más del 9,4% de los genes implicados en la regulación, característica relacionada con microorganismos que pueden sobrevivir en diversos ambientes (Stover y col., 2000). Además posee cerca de 300 sistemas de transporte de membrana citoplasmática, dos tercios de los cuales están aparentemente relacionados en el importe de nutrientes y otras moléculas y parecen tener los sistemas de quimiosensores más complejos de todos los genomas bacterianos conocidos. Finalmente, su genoma contiene un gran número (más de 10) de bombas de expulsión de medicamentos de la familia *resistance-nodulation-cell division* (RND), que probablemente jueguen el mayor papel en su habilidad para sobrevivir en las diversas condiciones ambientales, incluyendo las hospitalarias.

Ya se ha comentado el origen común de las cepas de *P. aeruginosa* que causan infección y de las que se encuentran en el ambiente, y es que este microorganismo no se especializa en diferentes líneas adaptándose a los diferentes nichos ecológicos como ocurre con otros microorganismos. De esta

manera, el mismo clon que infecta a pacientes FQ se ha encontrado con frecuencia en ambientes acuáticos (Römling y col., 1994) y se ha visto que tanto los aislados clínicos como los ambientales muestran propiedades tanto patogénicas como biodegradativas independientemente de su origen (Alonso y col., 1999).

Dado este origen común, las cepas de *P. aeruginosa* que causan infección aguda o crónica son inicialmente iguales y es durante la colonización a largo plazo donde tiene lugar la adaptación al entorno pulmonar. La selección de mutaciones adaptativas requeridas para la persistencia a largo plazo, junto con la atenuación de la virulencia y el desarrollo de múltiples resistencias antibióticas son los factores clave con los que la bacteria hace frente a la exposición crónica al entorno pulmonar incluyendo la respuesta inmune innata y adquirida de los pacientes, los múltiples y prolongados tratamientos antibióticos administrados y la compartimentalización espacial y fisiológica. Desde el punto de vista clínico, la adaptación de *P. aeruginosa* al entorno pulmonar presenta claras consecuencias negativas; una vez que se ha establecido completamente la infección crónica la erradicación ya no suele ser posible y los objetivos pasan de tratar de curar la infección a evitar el declive de la función pulmonar y mejorar la calidad de vida del paciente.

### 3.1 Adaptación fisiológica en la infección crónica: biofilms

Una de las características de las infecciones crónicas bacterianas es el modo de crecimiento en biofilm. Mientras que las infecciones agudas están producidas principalmente por células libres planctónicas de rápido crecimiento capaces de causar daño tisular rápido por invasión y citotoxicidad, las infecciones crónicas están producidas por células que crecen en comunidades multicelulares bien estructuradas y organizadas embebidas en una matriz polimérica que producen ellas mismas y que les permite adherirse a superficies inertes o vivas (Costerton y col., 1999). Sin embargo, los biofilms pueden jugar también un papel indirecto importante en las infecciones agudas nosocomiales gracias a la formación de biofilms en las superficies inertes de tubos endotraqueales o catéteres que generalmente preceden a una neumonía asociada a ventilación mecánica o a infecciones del tracto urinario en pacientes sondados.

La transición de células planctónicas al crecimiento en biofilm, que conlleva cambios fisiológicos profundos, se consigue a través de un complejo proceso secuencial que incluye al menos 5 pasos bien diferenciados caracterizados usando modelos *in vitro* (Sauer y col., 2002):

- i) *Unión reversible*. Las células planctónicas contactan con la superficie y se van fijando a ella. En este paso se requiere la expresión del flagelo.
- ii) *Unión irreversible*. La motilidad cesa, las células comienzan a agregarse en una unión que ya no será reversible.
- iii) *Maduración I*. Los agregados de células van formando capas progresivamente (de más de 10  $\mu\text{m}$  de grosor), se observan grandes diferencias en el patrón de expresión de proteínas comparado con las células planctónicas.
- iv) *Maduración II*. Los agregados de células alcanzan el máximo grosor (alrededor de 100  $\mu\text{m}$ ), la mayoría de las células son segregadas dentro de los agregados celulares, estos agregados son desplazados de la superficie, y se observan grandes diferencias en los patrones de expresión de proteínas (más de un 50 % de diferencias en la expresión de proteínas en comparación con el

crecimiento planctónico).

v) *Dispersión*. Algunas células se convierten en móviles otra vez y se alejan de las partes más internas de los agregados celulares, recuperando un perfil de expresión de proteínas similar al de las células planctónicas.

Se ha visto que la comunicación entre células juega un papel muy importante en el establecimiento de biofilms maduros de *Pseudomonas aeruginosa* bien estructurados (Davies y col., 1998). Las señales de célula a célula ocurren cuando la población alcanza densidades suficientes (llamado por esta razón *quorum sensing*), e incluye, al menos, dos sistemas, *lasR-lasI* y *rhIR-rhII*, que han sido comentados anteriormente (apartado 2.3 de virulencia). *LasI* cataliza la síntesis de una señal extracelular difusible, N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserina lactona (C<sub>12</sub>-HSL). *LasR* es un regulador transcripcional que requiere una cantidad suficiente de C<sub>12</sub>-HSL para activar una serie de genes de virulencia (incluyendo aquellos que codifican para las elastasas *LasA* y *LasB*), *lasI* (mecanismo feedback) y *rhIR-rhII*. *RhII* cataliza la síntesis de la molécula señal N-butilil-L-homoserina lactona (C<sub>4</sub>-HSL) que se requiere para la activación de la expresión por *RhIR* de ciertos genes de virulencia (como el ramnolípido) y el factor  $\sigma$  de fase estacionaria *RpoS*. Se sabe que los sistemas *lasR-lasI* y *rhIR-rhII* se activan en el segundo paso (unión irreversible) y tercer paso (maduración I), respectivamente, del desarrollo del biofilm (Sauer y col., 2002).

Estudios recientes sugieren que la transición de las células planctónicas al crecimiento en biofilm, y por lo tanto la transición del estilo de vida agudo a crónico, está recíprocamente controlado por los reguladores globales de virulencia *RetS* y *LadS* (Ventre y col., 2006). Mientras que la señal de *RetS* se ha visto que activa genes que se requieren para la infección aguda (como las secreciones de tipo III) y que reprime genes que se requieren para la infección crónica (como aquellos que promueven la formación del biofilm), se ha visto que la señal de *LadS* produce el efecto contrario.

Otro trabajo ha mostrado que *P. aeruginosa* forma biofilms anaerobios en los pulmones de pacientes infectados crónicamente y estudios *in vitro* han

demostrado que esta bacteria aerobia paradójicamente prefiere aparentemente la respiración anaerobia en biofilms usando nitratos, nitritos y óxido nitroso como aceptores terminales de electrones (Yoon y col., 2002). Muchos genes son expresados de manera diferente en los biofilms anaerobios vs aerobios haciendo la expresión de la reductasa de óxido nítrico (NO) (que previene la acumulación de este bioproducto tóxico de la respiración anaerobia) y de la proteína de membrana externa OprF factores clave para el modo de crecimiento del biofilm anaerobio.

La trascendencia de los biofilms de *P. aeruginosa* en la persistencia de las infecciones crónicas recae en su elevada resistencia a los mecanismos de defensa del huésped, incluyendo el aclaramiento mecánico o aquellos mediados por el complemento, anticuerpos, o fagocitos, así como en una mayor tolerancia a los radicales de oxígeno reactivo y su elevada resistencia a la acción de los antimicrobianos, descrita como más de 100 veces mayor que en las células planctónicas. Se ha atribuido a muchos mecanismos la responsabilidad de la resistencia antibiótica del biofilm, que está todavía bajo cierta controversia. Entre ellos, la difusión disminuida (*trapping*) de los antimicrobianos a través de la matriz exopolimérica actuando sinérgicamente con enzimas inactivantes de antibióticos como las cefalosporinasas cromosómicas, la reducción del ratio de crecimiento simulando una fase estacionaria refractaria a la acción antimicrobiana, la activación de respuestas generalizadas de estrés, o la inducción de genes específicos del biofilm implicados en la resistencia (Bagge y col., 2004; Mah y col., 2001; Whiteley y col., 2001). La organización estructural de los biofilms parece promover la emergencia de poblaciones celulares heterogéneas incluyendo la selección de poblaciones mutantes con resistencia de alto nivel a antibióticos (Boles y col., 2004). En un trabajo muy reciente (Driffield y col., 2008) se comprobó que en el biofilm de *P. aeruginosa* se produce una menor expresión de enzimas antioxidantes. Por ejemplo, *katA*, que codifica para la mayor catalasa antioxidante pseudomonal, se expresaba 7,7 veces menos, favoreciendo, así, la acumulación de daños en el ADN provocados por las especies reactivas del oxígeno. Esto, por tanto, podría favorecer la selección directa de poblaciones resistentes a los antibióticos y además favorecer la aparición de hipermutadores

permanentes mediante mutaciones en los genes del sistema MMR, como *mutS*, que, a su vez, serían otra fuente de aporte de resistencia a los antibióticos.

### **3.2 Evolución de *Pseudomonas aeruginosa* en la IPC: mutaciones adaptativas para la persistencia.**

Aunque los pacientes FQ con IPC generalmente se colonizan o infectan por una única cepa de *P. aeruginosa* que, en muchos casos, persiste a lo largo de toda la vida del paciente (Römling y col., 1994), un sello de estas infecciones, además del crecimiento en biofilm, es la continua emergencia de múltiples variantes fenotípicas a partir de las poblaciones clonales colonizadoras (Oliver y col., 2000), proceso conocido como “radiación adaptativa” (*adaptative radiation*) (Rainey y col., 1998). Por tanto, tras años de colonización crónica se seleccionan múltiples variantes de mutantes dentro de estas poblaciones clonales, muchos de ellos claramente relacionados con la adaptación bacteriana al ambiente pulmonar y por tanto favoreciendo la persistencia en las infecciones crónicas (Oliver y col., 2007). La selección de variantes mucosas, SCVs, inmóviles, deficientes en LPS, auxotróficas o resistentes a múltiples antimicrobianos (frecuentemente coexistiendo) están entre las mutaciones adaptativas clave documentadas en las infecciones pulmonares crónicas por *P. aeruginosa*, muchas de ellas además asociadas con la reducción de la virulencia en modelos de infección aguda. El intenso proceso de adaptación genética que tiene lugar durante la infección pulmonar crónica ha sido recientemente documentado por aislados secuenciales de *P. aeruginosa* de FQ mediante la secuenciación del genoma completo (Smith y col., 2006). De hecho, se encontraron múltiples mutaciones adaptativas acumuladas tras años de colonización, muchas de las cuales conllevaban la pérdida de función de los genes afectados, que hay que resaltar que frecuentemente estaban implicados en la virulencia bacteriana. La exposición crónica a las condiciones del ambiente pulmonar, incluyendo la respuesta inmune innata y adquirida de los pacientes y los tratamientos múltiples y prolongados administrados, son aparentemente las principales fuerzas conductoras de esta

intensa selección de múltiples variantes fenotípicas. Desde el punto de vista ecológico, la naturaleza estructurada (compartimentalizada) del árbol endobronquial podría jugar también un papel importante en la explosiva diversificación de variantes fenotípicas (radiación adaptativa) ya que los modelos *in vitro* muestran que la diversificación fenotípica ocurre en hábitats estructurados en lugar de homogéneos reduciendo la competencia entre las variantes generadas (Rainey y col., 1998). Además, el modo de crecimiento en biofilm por si mismo favorece la diversificación, ya que los biofilms tienen una organización estructural en lugar de homogénea: las condiciones locales del entorno (como nutrientes, oxígeno y la exposición a la respuesta inmune del paciente o antibióticos) varían considerablemente dentro de cada biofilm. De hecho, se ha visto recientemente que los biofilms de *P. aeruginosa* experimentan una extensa diversificación genética en cortos periodos de crecimiento (Boles y col., 2004). Sin embargo, sea cual sea la naturaleza de la selección, la mutación y la recombinación son las fuentes genéticas fundamentales de la variación fenotípica. Como se comentará más adelante, todo este intenso proceso adaptativo está favorecido por la alta prevalencia de cepas hipermutadoras (cepas con frecuencias de mutación espontáneas hasta 1000 veces superiores a lo normal) en contraste con lo que se observa en procesos agudos (Oliver y col., 2000).

### **3.3 Hiperproducción de alginato (fenotipo mucoide)**

El alginato es un polímero de ácido D-manurónico y ácido D- gulurónico que forman un gel protector viscoso alrededor de la bacteria (Govan y Deretic 1996). Muchos de los genes que codifican para los enzimas de la biosíntesis de alginato forman un operón liderado por *algD*, que codifica la GDP manosa deshidrogenasa, el primer enzima implicado en la biosíntesis de alginato. La producción de alginato está altamente regulada y de hecho dos sistemas reguladores de dos componentes están implicados en la modulación de la expresión de *algD*, AlgQ/AlgR y KinB/AlgB. Todas las señales ambientales conocidas relacionadas con la producción de alginato incluyendo deshidratación, elevada osmolaridad,

niveles de oxígeno reducidos, falta de nutrientes, y bajas tasas de crecimiento están presentes en la infección pulmonar crónica por FQ. Un trabajo reciente, de hecho, ha demostrado que la síntesis de alginato está inducida *in vivo* en los pulmones de pacientes FQ y en un modelo de infección pulmonar crónica en ratones por *P. aeruginosa* (Bragonzi y col., 2005). Adicionalmente, la expresión de *algD* requiere el factor  $\sigma$  alternativo AlgU (AlgT) que es reprimido por el anti- $\sigma$  MucA resultando en una baja producción de alginato bajo condiciones no inductoras. Se sabe que la inactivación mutacional de MucA conlleva la hiperexpresión constitutiva de *algD* confiriendo el típico fenotipo mucoso estable de las cepas aisladas en infecciones crónicas pulmonares (Govan y Deretic 1996). La conversión mutacional al fenotipo mucoso es un sello de las infecciones crónicas pulmonares por *P. aeruginosa* (Figura 5). Las cepas mucosas se encuentran en el 80-90 % de los pacientes infectados crónicamente y están relacionadas con un peor pronóstico de la función pulmonar (Oliver y col., 2007).



**Figura 5.** Aislamientos de *P. aeruginosa* mucoside no pigmentado (A) y pigmentado (B) procedentes de pacientes con FQ con colonización crónica tras 48h de incubación en agar Müller-Hinton a 37°C.

También se sabe que el fenotipo mucoside reduce el aclaramiento bacteriano en modelos animales de infección pulmonar crónica (Yu y col., 1998). La inhibición de la fagocitosis (Oliver y col., 1985), la activación del complemento (Pedersen y col., 1990) y la penetración antibiótica (Hatch y col., 1998) y neutralización de los radicales del oxígeno (Simpson y col., 1989) están entre las propiedades de la hiperproducción de alginato promoviendo la persistencia de *P. aeruginosa* en el

entorno pulmonar.

### 3.4 Colonias enanas o puntiformes (*Small colony variants*)

Otra variante fenotípica importante frecuentemente encontrado en las infecciones pulmonares crónicas por *P. aeruginosa* (más del 50 % de los pacientes colonizados por *P. aeruginosa*) son las colonias enanas o puntiformes (Figura 6). Estos mutantes, caracterizados por su reducido tamaño de colonia (1-3 mm) en medio de cultivo en agar, ha sido asociado con resistencia antimicrobiana elevada, especialmente a los aminoglucósidos, y a una peor función pulmonar en los pacientes FQ (Häußler y col., 1999). Un trabajo reciente de Häußler y col. (2003) ha demostrado que un subgrupo frecuente de aislados SCV de pacientes FQ son hiperpiliados y muestran propiedades autoagregativas y una aumentada movilidad tipo *swarming*, adherencia a las células pneumocíticas y capacidad de formación de biofilm.



**Figura 6.** Aislamiento de *P. aeruginosa* con morfotipo puntiforme (SCV) procedente de un paciente con FQ con colonización crónica; 48h de incubación a 37°C en agar Müller-Hinton (**A**) y agar sangre (**B**)

Por lo tanto, se piensa que las SCV, como las variantes mucosas, contribuyen notablemente a la persistencia de la colonización crónica. Sin embargo, al contrario de lo que se piensa que ocurre en la infección crónica, se ha observado que este fenotipo es capaz de incrementar la expresión del sistema de secreción

tipo III presentando una mayor citotoxicidad y, por tanto, una mayor virulencia (von Götz y col., 2004). Otra característica de este fenotipo es su capacidad de revertir tras varios pases *in vitro* en su morfotipo de crecimiento rápido otra vez (revertientes) pero conservando el resto de características de las SCV.

### **3.5 Variantes inmóviles**

Mientras que el flagelo se considera un importante determinante de la virulencia necesario para el establecimiento de las infecciones agudas por *P. aeruginosa* y para los pasos iniciales de la infección pulmonar crónica, la colonización endobronquial y la formación del biofilm, el aislamiento de mutantes inmóviles de pacientes FQ crónicamente colonizados es, de hecho, un acontecimiento frecuente. Mahenthiralingam y col. (1994) mostraron que el 39 % de mil aislados de *P. aeruginosa* de pacientes FQ crónicamente colonizados eran inmóviles, un porcentaje dramáticamente mayor que el encontrado en los aislados ambientales (1,4%) o en otras condiciones clínicas (3,7%). Estos mutantes inmóviles no expresan ni flagelo ni pili y poseen las típicas características de los mutantes RpoN *like* que son resistentes a la fagocitosis por macrófagos, favoreciendo la persistencia de *P. aeruginosa* en el tracto respiratorio de pacientes con FQ. Este es uno de los ejemplos más representativos de las fuerzas opuestas que dirigen la selección hacia virulencia o persistencia que ocurre en las infecciones agudas y crónicas, respectivamente.

### **3.6 Otras mutaciones adaptativas**

Recientemente se ha observado que el gen que más frecuentemente aparece inactivado en los aislados de *P. aeruginosa* obtenidos de pacientes FQ con infección crónica es el regulador transcripcional *lasR* (Smith y col., 2006), que responde a la señal de una homoserina lactona para activar la expresión de determinados factores de virulencia aguda. Se ha visto que este fenotipo aparece relativamente temprano durante el desarrollo de la infección crónica y que su

inactivación confiere ventajas metabólicas para la adaptación de la bacteria durante la infección crónica. Además la inactivación de este gen resulta en un incremento de la actividad  $\beta$ -lactamasa, y, por tanto, en un aumento de la resistencia antibiótica (D'Argenio y col., 2007). Recientemente Hoffman y col. (2009) han demostrado que los mutantes *lasR* están relacionados con la progresión de la enfermedad pulmonar, ya que las alteraciones a nivel de la susceptibilidad antimicrobiana pueden tener implicaciones a la hora de aplicar una terapia antimicrobiana.

Las modificaciones del LPS también están entre las mutaciones adaptativas que se encuentran típicamente en pacientes con infección pulmonar crónica. Hancock y col. (1983) publicaron que los aislados FQ muy frecuentemente eran no tipificables y deficientes en la cadena O del LPS y Ernst y col. (1999) encontraron que tenían estructuras específicas del lípido A del LPS que contenían palmitato y aminoarabinosa, asociado con una resistencia aumentada a los péptidos catiónicos antimicrobianos y que, por lo tanto, favorecen la persistencia mediante el aumento de la resistencia a la respuesta inmune innata.

Otro marcador típico de la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* es la alta prevalencia de mutantes auxotróficos. El 86 % de los pacientes FQ estaban colonizados por mutantes auxotróficos de *P. aeruginosa* en un estudio, y representaban más del 50 % de todas las colonias aisladas en el 73 % de ellos (Taylor y col., 1993[a]). Se vio que la dependencia de metionina era el tipo de auxotrofia más frecuente (44 %). Aunque puede ser un marcador indirecto, la presencia de mutantes auxotróficos ha sido correlacionada con una mayor severidad de la enfermedad pulmonar y de la resistencia antibiótica en pacientes FQ (Taylor y col., 1993[b]).

En un trabajo muy reciente (Rodríguez-Rojas y col., en prensa) se ha descrito una nueva mutación adaptativa a tener en cuenta en el proceso de cronificación de la infección por *P. aeruginosa*. Las mutaciones en el gen *hmgA* son las responsables de la aparición del fenotipo hiperproductor de piomelanina, un fenotipo frecuente en la infección crónica por *P. aeruginosa*. Se ha observado que la inactivación de este gen mejora la adaptación en la infección crónica y además confiere mayor

resistencia frente al estrés oxidativo *in vitro*.

Hoy en día el estudio de posibles mutaciones adaptativas continúa siendo una de las claves fundamentales para el entendimiento de la adaptabilidad y persistencia de estas poblaciones bacterianas, no sólo en la IPC por *P. aeruginosa*, sino en cualquier tipo de infección crónica. Por ejemplo, se ha descrito que cepas FQ, en contraste con aquellos aislados procedentes de otras condiciones clínicas, frecuentemente presentan mutantes con la expresión desreprimida de *zwf*, que codifica la Glucosa 6- fosfato deshidrogenasa (Silo-Suh 2005). Se vio que la expresión de *zwf* es necesaria para la resistencia al esputo humano, sugiriendo que la selección de mutantes desreprimidos puede jugar un papel en la adaptación de *P. aeruginosa* al entorno pulmonar. Otro ejemplo sería el de un trabajo reciente (Mulcahy y col., 2008) en el que se examinó la función del regulador postranscripcional RsmA, relacionado con la producción de factores de virulencia, en modelos murinos de infección aguda y crónica. Los resultados de este trabajo demostraron que este regulador está implicado en la colonización y diseminación inicial en la infección aguda. Además, mientras la pérdida de RsmA resulta en una colonización reducida durante la fase inicial de la infección aguda, los resultados mostraron que mutaciones en *rsmA* finalmente favorecen la persistencia crónica y la mayor inflamación en los pulmones.

## 4 Hipermutación

### 4.1 Bases genéticas de la hipermutación

Una característica muy común de las infecciones crónicas por *Pseudomonas aeruginosa* incluyendo aquellas que se dan en pacientes con FQ, bronquiectasias o Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es la elevada prevalencia de cepas hipermutadoras, en contraste con lo que se observa en los procesos agudos (Ciofu y col., 2005; Gutiérrez y col., 2004; Maciá y col., 2005; Oliver y col., 2000). Las cepas hipermutadoras son aquellas que presentan una elevada frecuencia de mutación producida por errores generados en genes implicados en los sistemas de reparación del ADN o en los sistemas que se encargan de evitar errores (Miller 1996), por ello se les conoce como genes mutadores. En algunos casos la hipermutación se produce como respuesta a daños en el ADN, en otros, es debido a situaciones extremas de estrés.

Existen diversas vías posibles, conocidas hasta el momento, que pueden ser las responsables del incremento de la tasa de mutación. La primera de ellas sería un tipo de mutabilidad constitutiva debida a la incapacidad de detectar y reparar los errores producidos en la replicación. En las cepas de *P. aeruginosa* que provienen de pacientes con infección crónica, así como en otras poblaciones bacterianas (LeClerc y col., 1996; Matic y col., 1997), el sistema más frecuentemente implicado es el Sistema de Reparación de Emparejamientos Erróneos o *Mismatch Repair System* (MMR) y *mutS* el gen más frecuentemente afectado (Maciá y col., 2005; Oliver y col., 2002[a]). De hecho, la prevalencia de cepas hipermutadoras deficientes en el sistema MMR en infección crónica es muy alta, detectándose en un 30-60% de los pacientes, en contraste con las infecciones agudas donde la prevalencia es menor de un 1% (Ciofu y col., 2005; Gutiérrez y col., 2004; Maciá y col., 2005; Montanari y col., 2007; Oliver y col., 2000; Oliver y col., 2002[a]). Las alteraciones en este sistema de reparación no son únicamente importantes por ser la causa más frecuentemente de hipermutación en las poblaciones bacterianas sino que además se han relacionado frecuentemente con el cáncer en humanos

(Leach y col., 1993).

La inactivación de alguno de los genes clave implicados (*mutS*, *mutL*, *mutH* y *uvrD* o *mutU*) aumenta la frecuencia de mutación entre 100 y 1000 veces más de lo normal. En *Escherichia coli* el reconocimiento de la hebra de nueva formación se basa en que el ADN, después de sintetizarse, es metilado por la deoxiadenuina metil-transferasa (DAM) que añade un radical metilo al N6 de la adenina de la secuencia d(GATC). Por tanto, la nueva hebra justo después de la replicación no estará todavía metilada y por eso será reconocida (Palmer y col., 1994). Por esta razón, a este sistema se le conoce también como sistema de reparación de emparejamientos erróneos dirigido por metilación (*Methyl-Directed Mismatch-Repair*; MDMR) o sistema de reparación de emparejamientos erróneos dirigido por DAM (*DAM-Directed Mismatch-Repair*; DDMR).

MutS reconoce y se une al emparejamiento erróneo y además presenta actividad ATPasa, función que puede intervenir en el propio proceso de reconocimiento y en la señalización para las otras moléculas en la formación del complejo MMR. MutL, otra proteína con actividad ATPasa es requerida para mediar la interacción entre MutS y MutH. MutH es una endonucleasa específica de metilación que escindiré la hebra de ADN no metilada en la secuencia d(GATC). Después de que MutH haya cortado la hebra que contiene el nucleótido erróneo, la ADN helicasa (UvrD) separa las dos hebras, las exonucleasas digieren el ADN desde el punto de corte (sitio d(GATC)) hasta pasado el nucleótido erróneo, la ADN polimerasa III asistida por las proteínas de unión a ADN de hebra simple (SSB) rellena el hueco producido y finalmente la ADN ligasa sella la hebra. No todos los microorganismos, entre ellos *P. aeruginosa*, tienen homólogos *dam* y *mutH*, y por lo tanto el reconocimiento de la hebra nueva no estará basado en la metilación sino en vías alternativas de reconocimiento.

Por el contrario los genes *mutS*, *mutL* y *uvrD* si están conservados en *P. aeruginosa*, siendo su inactivación la causa más frecuente de hipermutación en esta especie (Hogardt y col., 2006; Oliver y col., 2002[a]). En este sentido, 7 de las 11 cepas caracterizadas en un trabajo previo (Oliver y col., 2002[a]), mediante estudios de complementación y secuenciación, fueron deficientes en alguno de

estos genes (4 *mutS*, 2 *mutL* y 1 *uvrD*). En cuatro de las siete cepas (3 *mutS* y 1 *mutL*) se encontró que la inactivación de los genes era debida al cambio del marco de lectura producido por la inserción o delección de uno o dos nucleótidos. En la cuarta cepa *mutS* se encontró una inserción de 3,3 Kb después del décimo nucleótido del gen y una delección de 54 nucleótidos producida entre dos repeticiones directas de 8 nucleótidos, siendo esta delección la principal responsable de la inactivación del gen. La segunda cepa *mutL* presentó la mutación K310M, equivalente a la K307 de *E. coli*, residuo esencial para la actividad ATPasa de MutL. Por último, la cepa *uvrD* presentó tres mutaciones en el sitio conservado de unión de ATP también esencial para la actividad de la ADN helicasa II.

Además de la actividad del MMR de prevenir la acumulación de mutaciones producidas por la replicación de errores, este sistema es el inhibidor más potente de la recombinación entre secuencias moderadamente divergentes (homeólogas) impidiendo así la recombinación entre especies evolutivamente cercanas como *E. coli* y *Salmonella* (Matic y col., 1995). Por lo tanto, la inactivación del sistema de reparación, además del aumento de la frecuencia de mutación, aumenta la frecuencia de recombinación homeóloga.

Mutaciones en el gen que codifica para la subunidad  $\epsilon$  de la ADN pol III, denominado *dnaQ* o *mutD*, conducen a un fenotipo mutador extremadamente fuerte, llegando a aumentar la tasa de mutación hasta 10.000 veces y además producen una reducción de la tasa de crecimiento. Las mutaciones que se producen en las cepas defectivas en *mutD* incluyen todo tipo de sustituciones de bases, siendo el número de mutaciones tan elevado que se produce la saturación del MMR. El fenotipo mutador de este tipo de mutantes es tan grande que no se ha encontrado en cepas naturales (Echols y col., 1983).

Otros genes mutadores son aquéllos que se encargan de prevenir o corregir el daño oxidativo del ADN, especialmente las lesiones mediadas por 8-oxodG; éstos son principalmente *mutM*, *mutY* y *mutT* que forman parte del sistema GO. Las mutaciones en *mutM* y en *mutY* conllevan un fenotipo mutador débil y moderado respectivamente, incrementando, específicamente la tasa de mutaciones

G:C→T:A. Por otro lado, las mutaciones en *mutT* producen un fenotipo mutador fuerte siendo prácticamente todas las mutaciones producidas cambios A:T→C:G. Estos genes han sido caracterizados en *Pseudomonas aeruginosa* (Oliver y col., 2002[b]) mediante clonación, secuenciación y complementación observando que MutT tiene una doble funcionalidad en *Pseudomonas aeruginosa*, siendo el extremo C-terminal idéntico en un 40 % a una secuencia consenso de las tiamina monofosfato sintasas; mientras que la parte N-terminal de la proteína es necesaria para la actividad 8-oxodGTP hidrolasa.

Por último, otros genes mutadores son aquellos que codifican para el ARNt, que por mutación dan lugar a los genes mutadores *mutA* y *mutC*; y también genes implicados en la prevención del daño oxidativo producido por los radicales libres del oxígeno, como *oxyR* y *sodA*. Recientemente se ha descrito un nuevo gen mutador en *P. aeruginosa*, el gen *pfpl*, que confiere protección frente a niveles basales de las especies reactivas del oxígeno y frente a determinadas situaciones de estrés (Rodríguez-Rojas y Blázquez 2009).

Existe una segunda vía responsable de la hipermutación de tipo transitoria e inducible a través de la acción de las ADN polimerasas de baja fidelidad (*error-prone*), ADN polIV (*dinB*) y polV (*umuDC*), como parte de la respuesta SOS. Es un tipo de estrategia que supone un coste evolutivo menor para la bacteria y la producción de mutaciones únicamente cuando son necesarias. De hecho, la exposición a determinados antibióticos puede inducir un fenotipo mutador transitorio debido a este mecanismo (Blázquez y col., 2002; Blázquez y col., 2006).

## 4.2 Hipermutación y adaptación

Se ha documentado que la presencia de cepas hipermutadoras está relacionada con los altos índices de resistencia antibiótica de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* recogidos de pacientes con infecciones pulmonares crónicas (Ciofu y col., 2005; Maciá y col., 2005; Oliver y col., 2002[a]) y tanto experimentos *in vivo* como *in vitro* han demostrado que la hipermutación acelera dramáticamente el desarrollo de resistencia antibiótica (Maciá y col., 2006; Oliver y col., 2004). Sin embargo, la relación entre hipermutación y la adaptación genética requerida para la persistencia a largo plazo en las infecciones crónicas, además de aquellas que provocan resistencia antibiótica, no han sido todavía demostradas.

Aproximaciones teóricas y de laboratorio han demostrado que bajo circunstancias particulares, como la exposición a nuevos ambientes o a condiciones de estrés, en las poblaciones bacterianas se seleccionan aislados hipermutadores debido a las mutaciones adaptativas que producen más frecuentemente que las células normales, jugando, por lo tanto, un papel en la evolución (Mao y col., 1997; Nilsson y col., 2004; Sniegowski y col., 1997). Un buen ejemplo sobre cómo las células hipermutadoras pueden ser amplificadas en una población bacteriana mediante mutaciones adaptativas fue realizado por Mao y col. (1997). En este trabajo se vio que cuando poblaciones de *E. coli* eran sometidas en un solo paso a un proceso de selección de una mutación (por ej. un cultivo en un medio en el que sólo pueden crecer células con una mutación determinada), las variantes hipermutadoras eran amplificadas en la población aproximadamente desde el 0,001% al 0,5 % y cuando eran sometidas a dos pasos consecutivos de selección de mutantes la amplificación crecía al 25-100%. Un aumento similar de células mutantes deficientes en el sistema MMR se encontró tras la selección de recombinantes en una mezcla interespecies entre *Salmonella* y *E. coli* (Funchain y col., 2001). Estos resultados demostraron que la transmisión horizontal de genes podría seleccionarse también para cepas hipermutadoras durante la evolución adaptativa debido a la elevada frecuencia de recombinación homeóloga de las células deficientes en el sistema MMR. Varios modelos *in vivo* han demostrado,

además, que la hipermutación debe favorecer la adaptación y persistencia de los patógenos bacterianos. Giraud y col. usando un modelo murino de colonización intestinal por *E. coli*, encontraron que la hipermutación inicialmente era beneficiosa, porque permitía una adaptación más rápida al medio intestinal del ratón aunque esta ventaja desaparecía una vez que se alcanzaba la adaptación y la transmisibilidad de las cepas hipermutadoras se reducía entonces considerablemente debido a la acumulación de mutaciones deletéreas (Giraud y col., 2001). Un resultado similar fue obtenido por Nilsson y col. cuando estudiaron la adaptación de *Salmonella typhimurium* al sistema retículoendotelial del ratón (Nilsson y col., 2004). Esto explicaría porqué en las poblaciones ya adaptadas al medio la proporción de hipermutadores permanece tan baja. Finalmente, se ha demostrado recientemente que la inactivación del sistema de reparación de emparejamientos erróneos en *E. coli* favorece la persistencia de infecciones del tracto urinario en un modelo de ratón (Labat y col., 2005). Precisamente, parte de esta tesis doctoral se centra en el estudio del efecto que la hipermutación, causada por la inactivación del sistema MMR, provoca sobre la colonización y adaptación de *P. aeruginosa* a las vías aéreas en la FQ.

Existen evidencias filogenéticas de recombinación de genes del sistema MMR en cepas naturales de *E. coli* a través de mecanismos de transferencia horizontal, y en concreto, del gen *mutS*, según se muestra en estudios recientes (Brown y col., 2001; Denamur y col., 2000). Este hallazgo, sustenta la hipótesis de que tras conseguir la bacteria adaptarse al medio, ayudada por la hipermutación, se restaura el genotipo MMR “wild-type” a través de procesos de recombinación, evitando así, los efectos perjudiciales de una frecuencia de mutación elevada en ausencia de presión selectiva.

### **4.3 Hipermutación y virulencia**

En un principio, LeClerc y col. (1996) sugirieron que la hipermutación debía jugar un papel importante en la evolución de las cepas patógenas, ya que encontraron una alta prevalencia (1%) de cepas hipermutadoras en aislados patógenos de *E.*

*coli* y *Salmonella*; sin embargo, poco después Matic y col. (1997) encontraron una prevalencia similar de cepas hipermutadoras en aislados comensales de *E. coli*. Más recientemente, Picard y col. (2001) evaluaron la virulencia de una colección de cepas hipermutadoras y no hipermutadoras de *E. coli* en un modelo murino de infección peritoneal. Estos autores encontraron que muchas de las cepas hipermutadoras poseían un fenotipo de virulencia inusual caracterizado por la falta de correspondencia entre el número de determinantes de virulencia y la patogenicidad así como por la expresión de un nivel de virulencia intermedio. Otro ejemplo sería el del trabajo realizado por Giraud y col. (2001), comentado anteriormente, en el que los ratones infectados con cepas de *E. coli* hipermutadoras se adaptaban más rápidamente, sin embargo, perdían su capacidad de transmitirse y/o colonizar nuevamente otros ratones.

Varios estudios han determinado también si la inactivación de los genes del sistema de reparación de emparejamientos erróneos tiene un efecto directo en la patogenicidad con resultados variables. Merino y col. (2002) demostraron que la delección del locus *mutSL* en *Lysteria monocytogenes* reduce la virulencia (aumentando 1 log la DL<sub>50</sub>) de este patógeno intracelular en un modelo murino de infección, mientras que por el contrario, la inactivación de *mutS* parece no tener ningún efecto directo sobre la virulencia en modelos animales de infección por *E. coli* o *Salmonella* (Picard y col., 2001, Zahrt y col., 1999). Este aspecto se ha estudiado también en este trabajo de tesis doctoral en cepas de *P. aeruginosa* con el fin de conocer cuál es el efecto de la inactivación del sistema MMR sobre la virulencia.

#### **4.4 Hipermutación en poblaciones bacterianas naturales**

A mediados de los años 90 se describió una proporción mucho más alta de lo esperado (alrededor del 1%) de cepas hipermutadoras de *E. coli* y *Salmonella* en poblaciones naturales (LeClerc y col., 1996; Matic y col., 1997). Estos datos en concordancia con los resultados obtenidos mediante experimentos *in vitro* sugirieron que la hipermutación podría actuar como un mecanismo de aceleración

de la evolución bacteriana en la naturaleza. La primera evidencia de que un ambiente específico conduce a la selección de cepas hipermutadoras en poblaciones naturales se obtuvo del estudio de la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* en pacientes FQ, en los que la prevalencia de cepas hipermutadoras es, de lejos, la mayor encontrada jamás en la naturaleza (Oliver y col., 2000). Se encontró el 37 % de los pacientes FQ estaban colonizados por cepas hipermutadoras de *P. aeruginosa*, muchas de ellas deficientes en alguno de los genes del sistema MMR (*mutS*, *mutL*, o *uvrD*) (Oliver y col., 2000; Oliver y col., 2002[a]). Por otra parte, no se encontraron cepas hipermutadoras en pacientes con infección aguda sugiriendo esto una asociación entre cronicidad y selección de variantes hipermutadoras. Otros trabajos más recientes también han revelado que las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* de pacientes FQ frecuentemente son hipermutadoras (Prunier y col., 2003; Román y col., 2004). Se han encontrado, además, cepas hipermutadoras en poblaciones naturales de *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis* y *Klebsiella pneumoniae* (Bjorkholm y col., 2001; De Champs y col., 2004; Del Campo y col., 2005; Richardson y col., 2001).

Debido a la elevada frecuencia de mutación de las cepas hipermutadoras es de esperar que la hipermutación facilite la persistencia de la infección crónica incrementando la probabilidad de selección de mutaciones adaptativas. Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que la inactivación de *mutS* conlleva la aparición *in vitro* de múltiples variantes fenotípicas de *P. aeruginosa*, incluyendo los mutantes *lasR* y *mucA* (*mucA22*), simulando lo que se observa en la infección pulmonar en la FQ (Smania y col., 2004). En este sentido, una parte importante del trabajo que se presenta está dedicado a explorar cuál es la contribución de la hipermutación en la adaptación genética de *P. aeruginosa* a las vías aéreas de los pacientes con FQ.

En un trabajo reciente se muestra que la hipermutación no es específica de la FQ sino una característica común de las infecciones crónicas ya que se encontró una elevada frecuencia de cepas hipermutadoras en los pulmones de pacientes con bronquiectasias o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) colonizados

por *P. aeruginosa* (Maciá y col., 2005). El 57 % de los pacientes estudiados estaban colonizados por cepas hipermutadoras, muchas de las cuales eran deficientes en el gen *mutS* del sistema MMR.

#### **4.5 Hipermutación y resistencia a los antibióticos**

En los últimos años, la hipermutación está siendo reconocida como un problema relevante para la terapia antimicrobiana (Blázquez 2003; Chopra y col., 2003). La primera evidencia del papel de la hipermutación en el desarrollo de la resistencia antimicrobiana se obtuvo del modelo de infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa* en pacientes con FQ (Oliver y col., 2000). Los niveles de resistencia de las cepas de *P.aeruginosa* aisladas de pacientes FQ son sustancialmente mayores que aquellas encontradas en otros contextos, incluidas las cepas de pacientes de la UCI (Henwood y col., 2001; Oliver y col., 2000). El desarrollo de multiresistencia antimicrobiana tras años de tratamiento es un evento realmente común en este campo, y que frecuentemente conlleva al fracaso terapéutico. La resistencia a todos los agentes antimicrobianos usados en el tratamiento de la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa*, incluidos los  $\beta$ -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos, ha sido principalmente asociado con la selección de mutantes con hiperproducción de cefalosporinasa cromosómica, hiperexpresión de las bombas de expulsión, pérdida de proteínas de membrana externa o la alteración de las ADN-topoisomerasas (Livermoore 2002).

Como ya se ha comentado anteriormente, las cepas de *P. aeruginosa* que se aíslan de los pacientes FQ frecuentemente son hipermutadoras. Cuando se analizaron los niveles de resistencia antibiótica para ocho antimicrobianos se encontró que las cepas hipermutadoras eran significativamente más resistentes que las no-hipermutadoras representando un factor negativo importante para el tratamiento de las infecciones pulmonares crónicas en la FQ. Resultados similares se han obtenido recientemente por Ciofu y col. (2005) en una gran colección de aislados de *P. aeruginosa* de pacientes FQ de Dinamarca, encontrando adicionalmente una correlación entre la presencia de cepas hipermutadoras y el

estrés oxidativo causado por la inflamación pulmonar crónica. La relación entre *P. aeruginosa* hipermutadora y la resistencia antibiótica ha sido también documentada en otras infecciones crónicas como aquellas que se dan en los pacientes con bronquiectasias y EPOC (Maciá y col., 2005). Por ejemplo, se vio que el 42 % de las cepas hipermutadoras (representando el 53 % de todos los aislados) eran resistentes a múltiples antibióticos en contraste con el 0 % de las cepas no hipermutadoras. En otras palabras, todos los aislados resistentes a múltiples antibióticos (el 23 % de todos los aislados) eran hipermutadores. A pesar de que el desarrollo de resistencia antibiótica mutacional era un resultado frecuente de las infecciones por *P. aeruginosa* en una UCI, la prevalencia de cepas hipermutadoras fue considerablemente menor (se encontró en solo 1 de 103 pacientes) mostrando que la resistencia antibiótica no debía ser el único factor determinante de la alta prevalencia de cepas hipermutadoras en las infecciones crónicas (Gutiérrez y col., 2004).

Recientemente se ha propuesto que las cepas hipermutadoras de *P. aeruginosa* deberían ser consideradas resistentes a muchos, si no todos, los antibióticos en monoterapia y que las combinaciones deberían usarse con el objetivo de evitar el desarrollo de estas resistencias (Oliver y col., 2004). Esta consideración se basó en la observación de que las CMBs y CMI<sub>s</sub> tardías (tras 36 h de incubación) de las cepas PAO $\Delta$ *mutS*, deficientes en el sistema MMR, para 11 agentes antipseudomónicos, determinadas por cultivo en microdilución, fueron sustancialmente mayores (de 4 a 6 veces más) que las de su cepa madre PAO1, superando en muchos antibióticos las concentraciones de punto de corte para la no susceptibilidad. Además se vio, mediante curvas de letalidad vs tiempo, que la elevada resistencia estaba producida por la selección de subpoblaciones de mutantes resistentes (SMR) durante el periodo de incubación y que la susceptibilidad podía restablecerse usando combinaciones de dos agentes antipseudomónicos. Estos resultados reflejan las importantes consecuencias de la hipermutación en microorganismos que están genéticamente equipados para adquirir resistencia eficaz a la mayoría de los antibióticos mediante mutaciones en genes cromosómicos como es *P. aeruginosa*. Interesantemente, cuando se

emplean los métodos de disco-difusión o de E-test para conocer la susceptibilidad de aislados de *P. aeruginosa* hipermutadora, se observa un doble efecto de la hipermutación sobre la resistencia antibiótica (Maciá y col., 2004). El primero es que las cepas hipermutadoras, como se observó en el estudio anterior (Oliver y col., 2000), son significativamente más resistentes a todos los antibióticos, reflejando probablemente la mayor eficacia para el desarrollo de resistencias durante la exposición antibiótica previa en el pulmón del paciente FQ. Además, la resistencia de los aislados hipermutadores aumenta todavía más dramáticamente debido a la presencia de SMR dentro de los halos de inhibición, producidos durante el crecimiento regular de las cepas (en ausencia de antibióticos) debido a las altas frecuencias de mutaciones espontáneas. La presencia de SMR dentro de las zonas de inhibición observadas para aislados de FQ de *P. aeruginosa* hipermutadora tiene por lo tanto las mismas bases que se mencionaron anteriormente de resistencia aumentada de la cepa PAO $\Delta$ mutS en el test de susceptibilidad por microdilución. La diferenciación entre estas dos consecuencias de la hipermutación puede tener por tanto consecuencias importantes para el diseño de opciones terapéuticas adecuadas a la hora de tratar a los pacientes FQ, ya que en contra de lo que pasa con la primera premisa la segunda se puede suprimir mediante el uso de combinaciones de antibióticos.

Finalmente, las consecuencias *in vivo* para el tratamiento de la hipermutación han sido recientemente investigadas en un modelo de infección pulmonar en ratones usando las cepas PAO1 y su derivado hipermutador PAO $\Delta$ mutS (Maciá y col., 2006). Se trataron grupos de 30 ratones durante 3 días con regímenes humanizados de ciprofloxacino, trobramicina, la combinación de ambos o placebo. A pesar de los parámetros adecuados de PK/PD (AUC<sub>24h</sub>/CMI=385), la persistencia de elevados números de bacterias y la amplificación (50.000 veces más) de mutantes resistentes (hiperexpresión de MexCD-OprJ) se documentó con tratamiento con ciprofloxacino para PAO $\Delta$ mutS en contraste con la completa supresión de la resistencia para PAO1, mostrando que los parámetros convencionales de PK/PD no pueden aplicarse a infecciones por cepas hipermutadoras. Sin embargo, se vio que la combinación de ciprofloxacino más

tobramicina era sinérgica, reduciendo la mortalidad y la carga bacteriana y previniendo completamente la resistencia incluso para PAO $\Delta$ *mutS*, demostrando así que es posible suprimir la selección de resistencia en infecciones por *P. aeruginosa* hipermutadora usando los regímenes de combinaciones apropiados.

Como en *P. aeruginosa*, existe también, una estrecha correlación entre la hipermutación y la resistencia a los antimicrobianos en las cepas de *S. aureus* y *H. influenzae* en la FQ. Prunier y col. (2003) observaron que la elevada prevalencia de cepas hipermutadoras de *S. aureus* encontrada en aislados de pacientes FQ debía estar relacionada con la elevada prevalencia de aislados que presentaban resistencia a eritromicina debido a mutaciones ribosomales. Del mismo modo, diversos trabajos (Pérez-Vázquez y col., 2007; Román y col. 2004), han puesto de manifiesto una gran asociación entre la alta prevalencia en FQ de cepas hipermutadoras de *H. influenzae* y la resistencia a ciprofloxacino (hasta un 43% de las cepas), siendo prácticamente inexistente la resistencia a este antibiótico en *H. influenzae* aislado de otros contextos clínicos.

## 5 Modelos murinos de IPC por *P. aeruginosa*

Hasta el momento se han descrito múltiples modelos de IPC por *P. aeruginosa* difiriendo, muchos de ellos, tanto en los métodos de vehiculización de las cepas bacterianas para simular el proceso de colonización e infección crónica, como en los métodos de inoculación o en el tipo de animales utilizados.

### 5.1 Vehiculación de la cepa bacteriana

En el proceso natural de adaptación de *P. aeruginosa* a las vías aéreas para causar infección crónica se producen importantes cambios fisiológicos representados, como ya se ha comentado anteriormente, por el cambio en el modo de crecimiento de las células en forma planctónica al crecimiento en forma de biofilm. Por este motivo, la mayoría de los modelos animales que tienen como objetivo el estudio de la IPC requieren que la bacteria esté embebida en un biofilm artificial de agar, agarosa o alginato de alga formando pequeñas motas o *beads* que impiden el aclaramiento mecánico tal y como ocurre en el pulmón FQ. Estos modelos simulan la infección crónica de las vías aéreas gracias al tamaño de estos *beads* que bloquean mecánicamente los bronquios. Además, la retención de *P. aeruginosa* dentro de los *beads* ralentiza el crecimiento de la bacteria simulando el crecimiento en forma de biofilm (van Heeckeren y Schluchter, 2002). Debe decirse, sin embargo, que en el modelo descrito por Nacucchio y col. (1984) no se observaron diferencias en los cambios histopatológicos y de inflamación pulmonar al administrar las bacterias de forma libre en presencia de *beads* de agar. El primer modelo de IPC por *P. aeruginosa* fue desarrollado por Cash y col. en 1979 en ratas normales, usando un inóculo de bacterias embebidas en *beads* de agar y que, posteriormente, Starke y col. (1987) modificaron en forma de *beads* de agarosa para su uso en ratones. Pedersen y col. (1990), desarrollaron también un modelo de IPC en ratas pero utilizando un inóculo con las bacterias embebidas en alginato de alga. El modelo de infección broncopulmonar crónica por *P. aeruginosa* mucosa en ratones con bloques de agarosa ha sido uno de los más

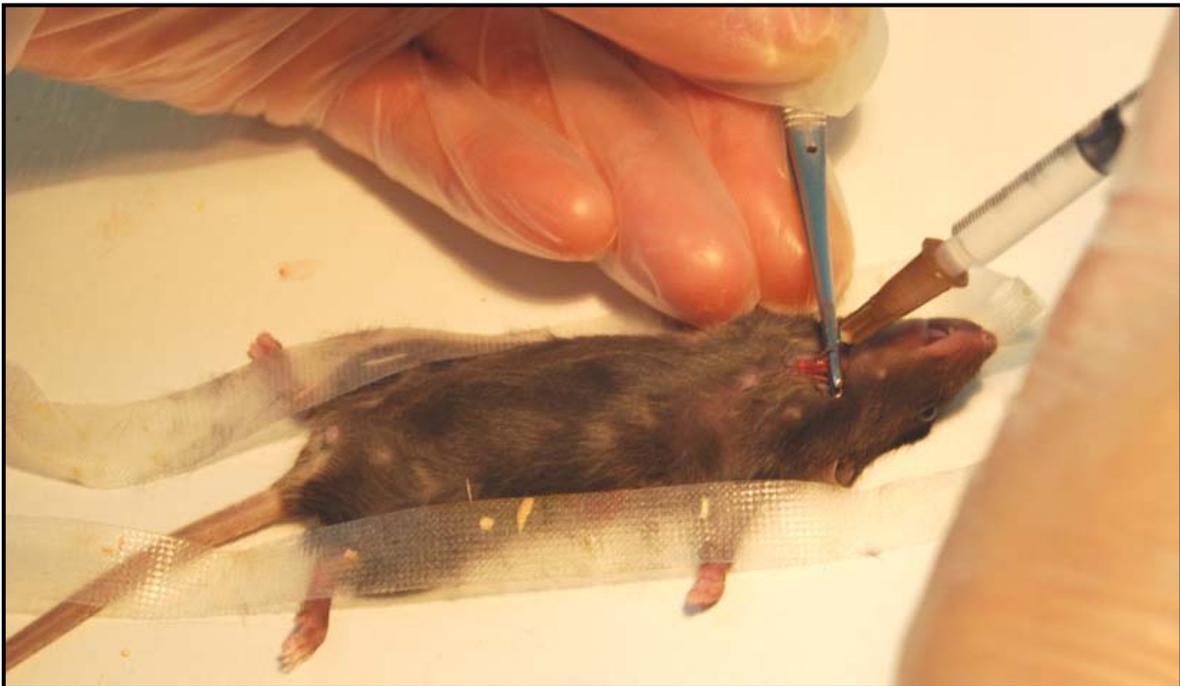
utilizados para el estudio de la patogénesis de la enfermedad pulmonar en la FQ (Beaulac y col., 1996; Cantin y Woods 1999; Cheung y col., 1993; Hart y col., 1993; Iwata y Sato 1991; Johansen y col., 1995; Konstan y col., 1990; Lange y col., 1995; Pennington y col., 1981; Song y col., 1998; Thomassen y col., 1984; Woods y col., 1982) y como modelo para el estudio de nuevos tratamientos (van Heeckeren y col., 1998). Este modelo, sin embargo no está exento de complicaciones en ratones ya que los *beads* de agarosa pueden causar un influjo de neutrófilos provocando la obstrucción de las vías aéreas hasta el punto en que no sea posible el intercambio gaseoso y el ratón muera.

Existen otros modelos en los que el inóculo se prepara directamente con cepas de *P. aeruginosa* mucosa obtenida a partir de muestras de pacientes con FQ (Morissette y col., 1995; Stevenson y col., 1995). Hoffmann y col. (2005) describieron un nuevo modelo de infección pulmonar crónica en ratones FQ utilizando una cepa clínica mucosa estable de *P. aeruginosa* (NH57388A) que, además, expresaba QS, y que podía establecer una infección pulmonar crónica sin necesidad de inoculación artificial de agarosa utilizando alginato purificado de la propia cepa para la preparación del inóculo. La expresión de QS en esta cepa contribuía a provocar una mayor severidad de la inflamación pulmonar y a una mayor mortalidad. Aunque el alginato producido por *P. aeruginosa* es muy similar al alginato de alga, existen diferencias importantes. Por ejemplo, el alginato pseudomonal produce un biofilm más elástico que se adapta mejor a los pulmones del ratón (Sherbrock-Cox y col., 1984).

## **5.2 Inoculación**

La mayoría de los modelos murinos de IPC se basan en técnicas invasivas, como la inoculación intratraqueal (traqueotomía), lo que supone que los efectos inflamatorios de las vías aéreas debido a la cirugía sean todavía mayores. Además, este tipo de técnicas se saltan las defensas primarias del huésped y no tienen en cuenta el proceso de colonización bacteriana inicial. Algunos investigadores han utilizado, con cierto éxito, la administración del inóculo

bacteriano en forma de aerosol, en una sola dosis o en dosis repetidas, (Chronos y col., 2000; McCray Jr y col., 1999; Yu y col., 1998) o la inoculación intranasal, en un intento de reproducir la adquisición y síntomas iniciales de la infección por *P. aeruginosa* en los pacientes FQ. Sin embargo, estos modelos de infección se utilizan, sobre todo, para el estudio de la infección e inflamación aguda en los pulmones, ya que los animales eliminan rápidamente la bacteria.



**Figura 7.** Imagen de la inoculación intratraqueal en ratones.

Guilbault y col. (2005) describieron un nuevo modelo de infección en ratones *knockout Cfr* mediante la inyección de *beads* de agarosa directamente en el pulmón a través de la boca (sin necesidad de traqueotomía) y por tanto mucho menos invasiva. Además esta técnica de entrada directa al pulmón permite una infección más rápida de los animales comparado con la técnica intratraqueal y simplifica la infección en términos de duración, invasividad y mejora la supervivencia de los ratones si se compara con el procedimiento intratraqueal.

Por otra parte, ya se ha comentado la importancia de simular unas condiciones lo más parecidas posible al proceso natural de la colonización e infección crónica. En

este sentido, Coleman y col. (2003) comprobaron que la presencia de *P. aeruginosa* en el agua de bebida de ratones transgénicos FQ provoca la colonización orofaríngea de todos ellos, es decir, tanto de los homocigotos como de los heterocigotos y *wild-type*; sin embargo al eliminar la bacteria del agua los ratones heterocigotos y *wild-type* la eliminan rápidamente a diferencia de los homocigotos en los que se consigue la colonización crónica pulmonar con la consiguiente afectación de la función pulmonar indicativa de IPC. Esto, además, demuestra el importante papel de los niveles de CFTR pulmonares en la defensa contra la infección. En este trabajo, también se pudo comprobar que en el caso de cepas mutantes de *P. aeruginosa* que no son capaces de formar alginato o bien de expresar el regulador GacA no se consigue la colonización del ratón. Este modelo, en el que se ha basado parte de nuestro trabajo, permite, por lo tanto, estudiar la virulencia bacteriana, evaluar la patofisiología pulmonar así como el desarrollo de nuevas terapias para el tratamiento de la FQ.

### **5.3 Animales**

No se conocen modelos naturales de animales con FQ, es por ello que continuamente se están describiendo nuevos modelos de infección. Los modelos de IPC por *P. aeruginosa* se han realizado en numerosas especies animales incluyendo ratas, ratones, cerdos de guinea o gatos. En todas estas especies, particularmente en los ratones, se pueden observar signos inflamatorios e histopatológicos similares a los que se observan en el pulmón de los enfermos de FQ. El modelo de IPC por *P. aeruginosa* se ha ido estableciendo, por tanto, en diferentes cepas de ratones criados, bien definidos genética e inmunológicamente, y que difieren en su susceptibilidad a la infección pulmonar. De este modo, Stotland y col. (2000) observaron que los ratones BALB/c son resistentes a la infección por *P. aeruginosa* mientras que los ratones DBA/2 son extremadamente susceptibles con una mortalidad muy elevada en tan solo tres días de infección. Por el contrario, tanto los ratones C57BL/6 como los A/J han resultado ser relativamente susceptibles presentando una baja mortalidad. También pudieron

observar que en los pulmones infectados de los ratones BALB/c y C57BL/6, la carga bacteriana se correlaciona con la magnitud y la calidad de la respuesta inflamatoria.

Un factor clave en el avance de estos modelos fue el desarrollo en 1992 de los ratones transgénicos (Doring y col., 1992). Durante estos años se han ido añadiendo refinamientos adicionales que han permitido desarrollar numerosas variantes de ratones deficientes en CFTR con alteración de la conductancia del Cl<sup>-</sup> mediada por AMPc y que dan lugar a diferentes fenotipos clínicos que van de medio a severo (Stotland y col., 2000). En un principio, estos modelos presentaron importantes limitaciones debido a la elevada mortalidad provocada por los síntomas intestinales, además muy pocos presentaban enfermedad pulmonar. Zhou y col. (1994) desarrollaron un modelo de ratones que expresan CFTR humano en el epitelio intestinal producido por la introducción transgénica de *cftr* bajo el control del promotor FABP, aumentando así la supervivencia. Por otra parte, mediante el cruce genético de diferentes cepas, se han desarrollado modelos de ratones que muestran un desarrollo espontáneo y progresivo de enfermedad pulmonar (Kent y col., 1997). Coleman y col., observaron que los ratones transgénicos homocigotos *Cftr*<sup>tm1Unc</sup>-Tg(FABPCFTR) 1 Jaw/J, los mismos utilizados en nuestro modelo de colonización orofaríngea, y que expresan CFTR humano a nivel intestinal, presentaban una mayor susceptibilidad para la colonización e IPC por *P. aeruginosa*. Debe tenerse en cuenta que estos ratones son más pequeños de lo normal y más sensibles a las condiciones nutricionales y de almacenamiento, sin embargo, la disponibilidad de los ratones *knockout cftr* ofrece una importante herramienta para el progreso en el entendimiento de la infección crónica por *P. aeruginosa* y la inflamación provocada en el pulmón FQ, así como la relación entre el defecto en CFTR y la infección.

#### 5.4 Aplicaciones de los modelos murinos de IPC por *P. aeruginosa*

Desde el establecimiento del primer modelo animal de IPC por *P. aeruginosa* en ratas por Cash y col. en 1979 se han descrito numerosos modelos animales de infección pulmonar aguda y crónica por *P. aeruginosa* (Johansen y col., 1996; Pedersen y col., 1990; van Heeckeren y Schluchter 2002). El interés de estos modelos animales obviamente radica en la posibilidad que ofrecen de estudiar diferentes aspectos simulando lo que ocurre realmente en el proceso de colonización y establecimiento de la IPC por *P. aeruginosa*. Por lo tanto, el desarrollo de estos modelos animales nos permite entender mejor la patofisiología de la inflamación y la patogénesis de la enfermedad pulmonar en la FQ. Los primeros trabajos realizados *in vivo* se centran en aspectos relacionados con la patogénesis en las vías respiratorias, mediante el estudio de las defensas innatas, el aclaramiento bacteriano o el proceso de inflamación pulmonar (Yanagihara y col., 2000; Yu y col., 1998; Yu y col., 2000).

Otros estudios realizados se han centrado en el análisis del papel que juegan los diferentes factores de virulencia de *P. aeruginosa* durante el establecimiento de la IPC (Imamura y col., 2005; Pierre y col., 2008; Yanagihara y col., 2003). En general, en el proceso de cronificación de la infección se produce una pérdida de la expresión de diferentes factores de virulencia, como el sistema de secreción tipo III, y a un aumento de la producción de alginato. La hiperproducción de alginato y, por tanto, el fenotipo mucoide, ha sido uno de los más estudiados en los modelos *in vivo* (Bragonzi y col., 2005; Hoffmann y col., 2005).

Como ya se ha comentado a lo largo de esta introducción, *P. aeruginosa* presenta una extraordinaria habilidad para adquirir resistencia antimicrobiana. Esto supone un factor especialmente crítico en el caso de las IPC, como ocurre en la FQ. Esto explica la importancia de muchos de los modelos murinos de IPC por *P. aeruginosa* que se han utilizado para analizar el efecto de diferentes tipos de antibióticos (Hoffmann y col., 2007; Nagata y col., 2003; Nagata y col., 2004; Yanagihara y col., 2002) y también para el establecimiento de pautas de tratamiento.

Otra característica común en la IPC por *P. aeruginosa* es la alta prevalencia de cepas hipermutadoras, en contraste con lo que ocurre en los procesos agudos. Diversos trabajos *in vitro* han aportado datos fundamentales para el estudio de la relación entre hipermutación y el desarrollo de resistencia antibiótica. Maciá y col. (2006) investigaron por primera vez, utilizando modelos *in vivo*, la eficacia terapéutica y el potencial para la selección de resistencia a ciprofloxacino y tobramicina, solos o en combinación, en cepas hipermutadoras, demostrando que es posible suprimir la selección de resistencia en este tipo de infecciones si se usan regímenes de combinaciones de antibióticos apropiados.

Con el objeto de profundizar en el estudio de la hipermutación y su papel en la IPC y debido a la falta de estudios en este sentido, nos planteamos realizar un modelo murino con ratones transgénicos FQ basado en el modelo de Coleman y col. (2003) para analizar la relación entre hipermutación y *fitness* e hipermutación y adaptación de *P. aeruginosa* a las vías aéreas



## II. Hipótesis y objetivos



Es un hecho demostrado que las cepas hipermutadoras, deficientes en el sistema MMR, son altamente prevalentes en las infecciones crónicas (30-60 %), mientras que, por el contrario, su frecuencia en las infecciones agudas es muy baja (<1%). No obstante, los motivos para estas diferencias entre estos dos modelos patogénicos no han sido aún esclarecidos. Si bien trabajos previos demuestran que existe una clara relación entre estas variantes hipermutadoras y el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos, hasta el momento, no se ha estudiado cuál es el efecto de la hipermutación sobre la virulencia y la capacidad de persistir (adaptarse) en las infecciones por *P. aeruginosa*. Por este motivo, nos planteamos estudiar cuál podía ser el efecto de la hipermutación, utilizando mutantes deficientes en el sistema MMR, sobre esos dos importantes aspectos, empleando para ello modelos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Recientemente, en un trabajo realizado por Smith y col. (2006) se demostró, y cuantificó, la intensa adaptación genética que *P. aeruginosa* experimenta durante el establecimiento de la infección respiratoria crónica en pacientes FQ. Al secuenciar completamente el genoma de dos aislados del mismo paciente observaron una clara señal de selección positiva debido a la acumulación de numerosas mutaciones durante los 8 años transcurridos entre la obtención de ambos aislados. Los resultados de Smith y col (2006) demostraron que en la persistencia a largo plazo se produce una selección de múltiples mutaciones, que afectan a numerosos genes, principalmente relacionados con el desarrollo de resistencia antibiótica y virulencia, provocando frecuentemente una pérdida de función. Esto nos ofrecía la posibilidad, utilizando la misma colección de aislados, de explorar cuál era el papel de la hipermutación en el curso real de la infección respiratoria crónica en humanos y, nuevamente, valorar el efecto sobre la virulencia y la adaptación genética de estas variantes hipermutadoras.

Los objetivos de este trabajo se resumen, por tanto, en:

1. Evaluar el efecto directo de la inactivación del Sistema MMR sobre el *fitness* de *P. aeruginosa in vitro*.
2. Evaluar el efecto directo de la inactivación del Sistema MMR sobre el *fitness* y la virulencia de *P. aeruginosa* en modelos animales de infección aguda.
3. Determinar si las elevadas frecuencias de mutación provocadas por la inactivación del Sistema MMR pueden favorecer el proceso de adaptación requerido para la persistencia a largo plazo en un modelo animal de colonización orofaríngea en ratones FQ.  
Como objetivo colateral nos planteamos evaluar el efecto que tienen los antibióticos de amplio espectro (Amoxicilina-Clavulánico), administrados frecuentemente en niños con FQ para evitar la colonización/infección por *S. aureus* o *H. influenzae*, sobre la colonización orofaríngea por *P. aeruginosa*.
4. Evaluar la prevalencia, las bases genéticas y la dinámica poblacional de los aislados hipermutadores de *P. aeruginosa* en una colección norteamericana de aislados de pacientes FQ.
5. Evaluar el papel de la hipermutación en el proceso de adaptación genética de *P. aeruginosa* a las vías aéreas en pacientes con FQ mediante la cuantificación de la adquisición de mutaciones adaptativas durante la infección respiratoria crónica.

### III. Materiales y métodos



# 1 Efecto de la inactivación del sistema MMR sobre el *fitness*, la virulencia y la persistencia de *P. aeruginosa*: experimentos *in vitro* e *in vivo*

## 1.1 Cepas bacterianas y plásmidos

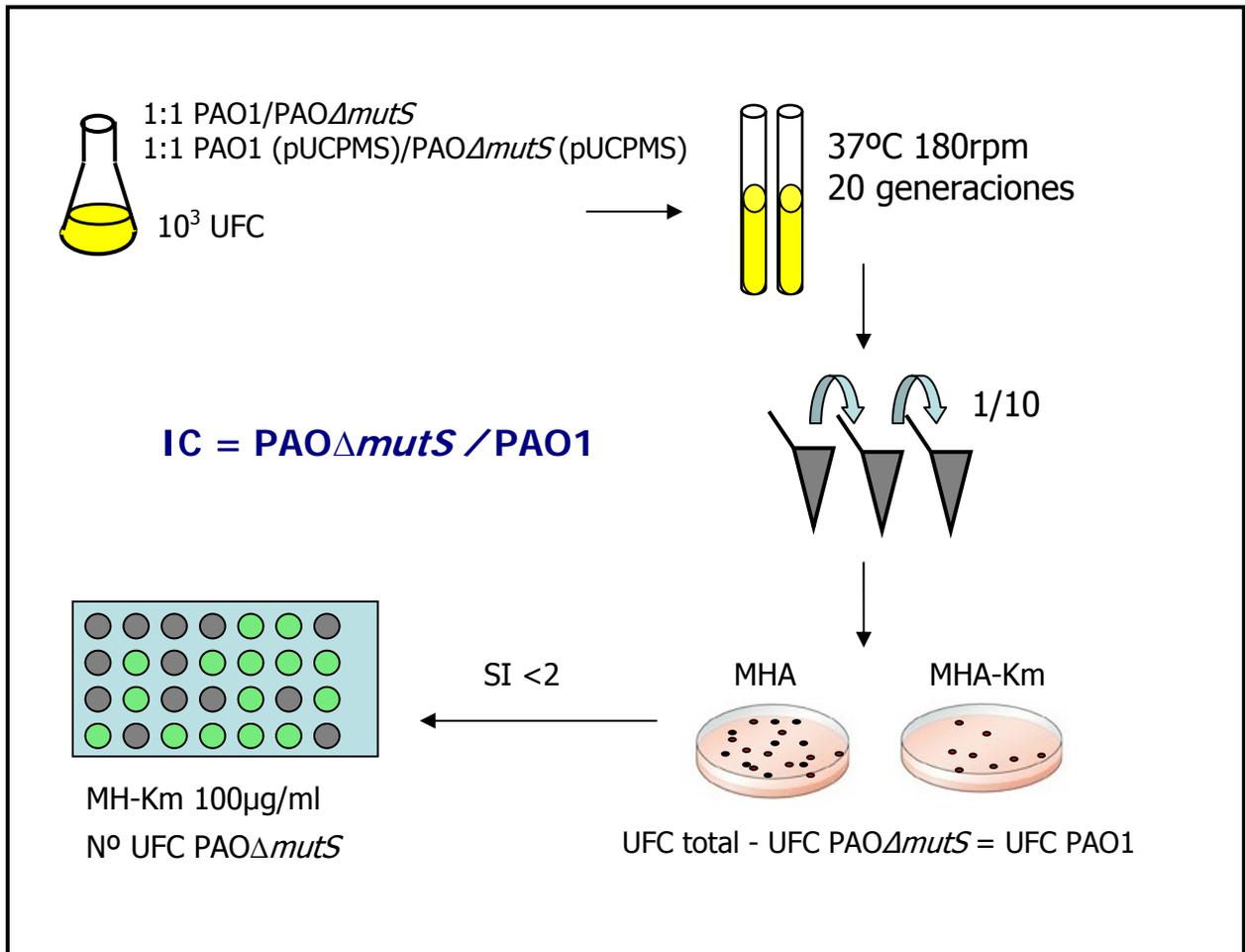
Se utilizaron las cepas PAO1, cepa de referencia de *P. aeruginosa* que ha sido completamente secuenciada (Stover y col. 2000) y su derivada deficiente en el sistema MMR, PAO $\Delta$ *mutS* (Oliver y col. 2004). PAO $\Delta$ *mutS* presenta una delección interna de 1.5 Kb en *mutS* que ha sido sustituida por un casete que confiere resistencia a kanamicina (Km) [APH(3')I].

Para la complementación de la deficiencia de *mutS*, el plásmido pUCPMS, que contiene el gen *mutS wild-type* de PAO1 y gentamicina [AAC(3')I] como marcador de resistencia, fue electroporado en PAO $\Delta$ *mutS* (y PAO1 como control) tal y como se ha descrito en trabajos anteriores (Oliver y col. 2004). Este procedimiento se describe con detalle en el apartado 2.4.2.

## 1.2 Experimentos de competición *in vitro*

Se realizó una mezcla 1:1 de cultivos en crecimiento exponencial en Luria-Bertani (LB) de PAO1 y PAO $\Delta$ *mutS* y se diluyó en suero salino al 0.9%. Aproximadamente  $10^3$  células de la mezcla se inocularon en ocho frascos con 10 ml de LB que se dejaron crecer a 37°C y 180 rpm durante 16-18h, correspondiendo aproximadamente a 20 generaciones. Se sembraron diluciones seriadas 1/10 por duplicado en agar Muller-Hinton (MH) y agar MH con 100  $\mu$ g/ml de km (MH-Km), para determinar el número de UFC total y de PAO $\Delta$ *mutS* respectivamente, tras incubación *overnight* a 37°C. Cuando la diferencia entre el número de colonias de las placas de agar MH y agar MH-Km era bajo (menos de 2 veces), 100 colonias seleccionadas al azar de las placas de agar MH fueron replicadas en pocillos de microdilución con 100  $\mu$ l de caldo MH con 100  $\mu$ g/ml de km. Según el crecimiento o no en los pocillos, tras incubación *overnight*, las colonias se contaron como PAO $\Delta$ *mutS* y PAO1, respectivamente. Se ha comprobado previamente que este

método es 100% específico para la discriminación entre ambas cepas. El índice de competición (IC) fue calculado determinando el ratio  $PAO\Delta mutS/PAO1$ . Los experimentos de competición *in vitro* también se realizaron con ambas cepas produciendo pUCPMS. Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente exceptuando que se añadieron 30  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina al LB.



**Figura 8.** Experimentos de competición *in vitro*

### 1.3 Modelo de infección sistémica aguda en ratones

Aproximadamente  $5 \times 10^6$  células en crecimiento exponencial de PAO1, PAO $\Delta$ mutS, o de la mezcla 1:1 de ambas cepas se inocularon intraperitonealmente a ratones ICR(CD1) de 20-25 g (Harlan Iterfauna Ibérica, Barcelona). Se analizó la mortalidad a los 7 días de la inoculación en grupos de 16 ratones (en dos experimentos independientes) para cada cepa. Para los experimentos de competición, un grupo de 16 ratones (de dos experimentos independientes) inoculados con la mezcla 1:1 fueron sacrificados 24h tras la inoculación y sus bazos fueron extraídos en condiciones asépticas y homogeneizados en 2 ml de suero salino al 0.9 % usando el dispersador Ultra-Turrax T-25 (IKA, Staufen, Alemania). El número de UFCs para cada cepa y los IC fueron determinados como se ha descrito para los experimentos de competición *in vitro*.

### 1.4 Modelo de infección respiratoria aguda en ratones

Se usaron hembras de ratones C57BL/6J de 20-25 g (Harlan Interfauna Ibérica, Barcelona). Antes de la inoculación los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con 100mg/kg de ketamina (Pfizer) y 10mg/kg de xilacene (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se realizó una incisión vertical en la zona media del cuello para poder acceder a la tráquea, y se inocularon transtraquealmente 20  $\mu$ l con aproximadamente  $5 \times 10^6$  células en crecimiento exponencial de PAO1, PAO $\Delta$ mutS o de la mezcla 1:1 de ambas cepas. Se analizó la mortalidad a los 7 días tras la inoculación en grupos de 24 ratones (en tres experimentos independientes) para cada cepa. Para los experimentos de competición, un grupo de 8 ratones inoculados con la mezcla 1:1 se sacrificaron tras 48h de la inoculación, sus pulmones se extrajeron en condiciones asépticas y se homogeneizaron en 2 ml de suero salino al 0.9 %. El número de UFCs para cada cepa y los IC se determinaron como ya se ha descrito anteriormente.

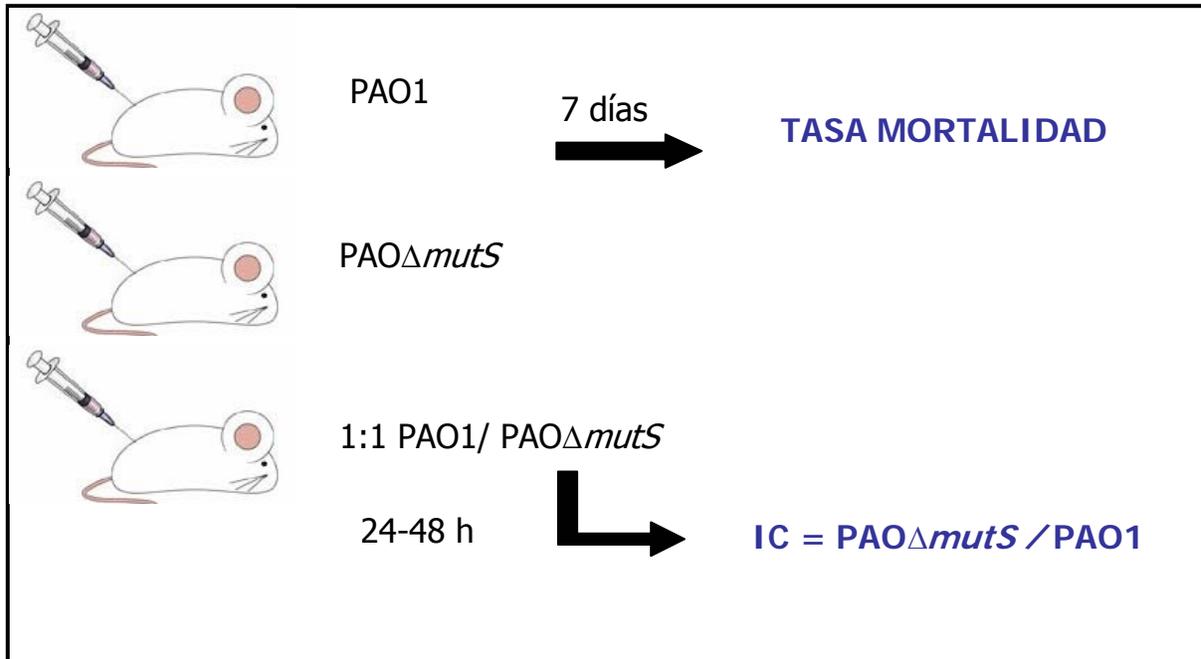


Figura 9. Modelo de infección aguda en ratones

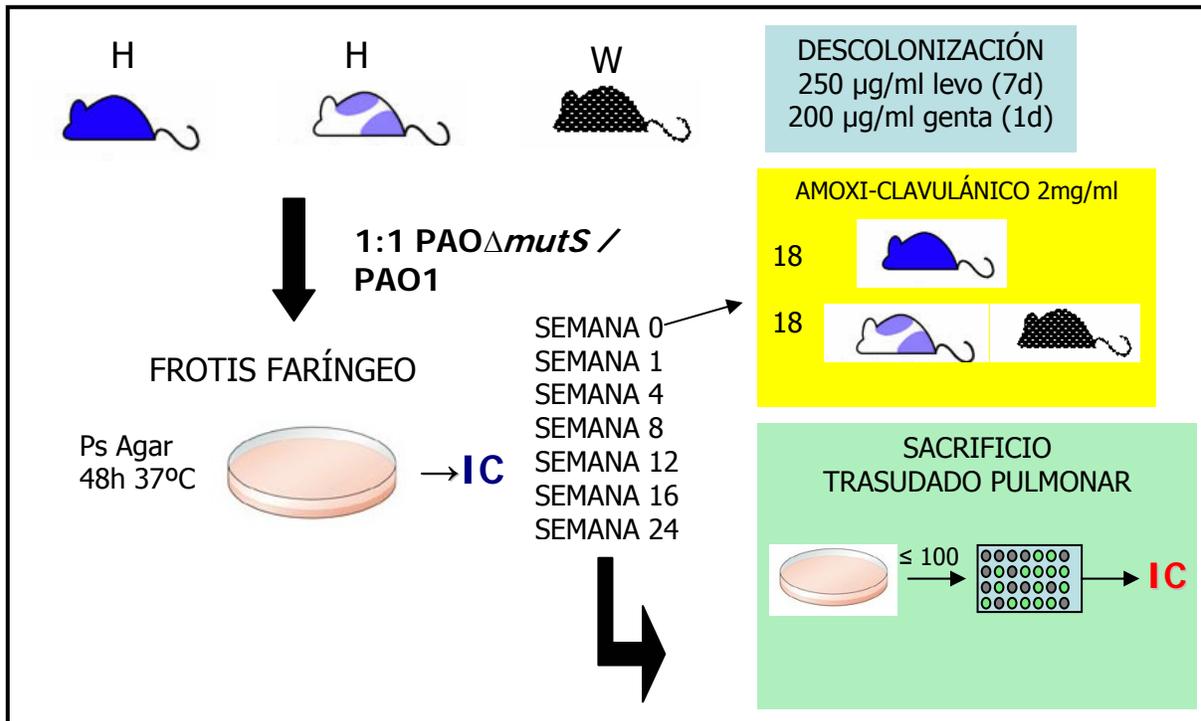


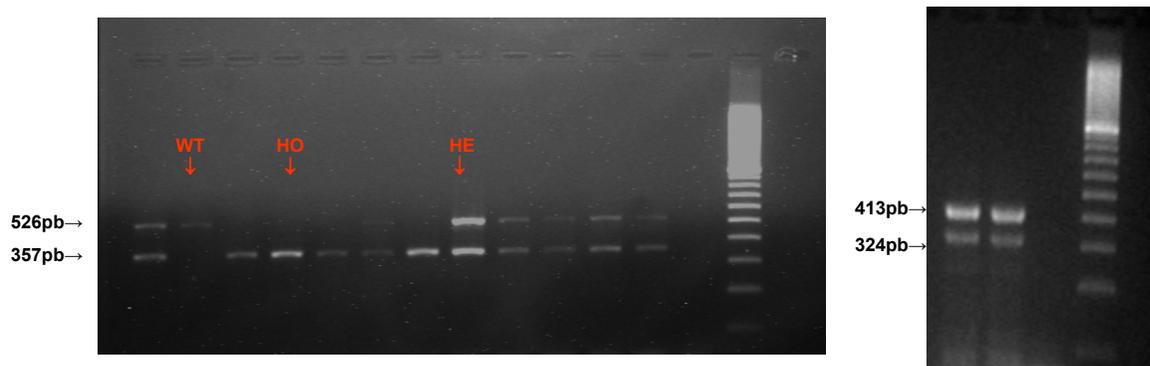
Figura 10. Modelo de colonización orofaríngea en ratones FQ

### 1.5 Modelo de colonización orofaríngea en ratones con FQ

Se utilizaron para este modelo ratones *Cftr*<sup>tm1Unc</sup>-Tg(FABPCFTR) 1 Jaw/J (ratones con FQ). Estos ratones poseen un casete de neomicina insertado en el exón 10 del gen *cftr* murino en la secuencia que corresponde al codon 489 de la proteína codificada, creando un codon stop en esta posición (S489X). Además expresan CFTR humano en el epitelio intestinal producido por la introducción transgénica de *cftr* bajo el control del promotor FABP (Zhou y col., 1994). Se obtuvieron parejas de heterocigotos (The Jackson Laboratory) a partir de los cuales se generaron líneas de homocigotos. Se utilizaron ratones *wild-type* C57BL/6J como controles. Para el genotipado de los ratones, se purificó ADN de un segmento de 0.4-0.6 cm de sus colas, usando el Dneasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania). Siguiendo las recomendaciones de los proveedores (<http://jaxmice.jax.org/pubcgi/protocols>), se usaron los cebadores que se describen en la Tabla 3 para la amplificación por PCR de los alelos murinos *cftr* mutado y salvaje y para la detección del transgen humano CFTR usando como control interno un fragmento de IL-2 (Figura 11).

**Tabla 3.** Cebadores utilizados para el genotipado de los ratones FQ.

Cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño del fragmento amplificado	Uso
IMR1125	GAGAACTGGAAGCTTCAGAGG	526 pb	Amplificación de los alelos murinos <i>cftr</i> mutado y salvaje
IMR1126	TCCATCTTGTTCAATGGCC	(mutado) 357 pb	
IMR1127	TCCATGTAGTGGTGTGAACG	(salvaje)	
IMR1011	AACTTCTAATGGTGATGACAG	413 pb	Detección del transgen humano CFTR
IMR1012	AGAAATTCTTGCTCGTTGAC		
IMR0042	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	324 pb	Control interno (IL-2)
IMR0043	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC		



**Figura 11.** Electroforesis de las PCRs para genotipado de los ratones transgénicos FQ.

El procedimiento usado para el establecimiento de la colonización orofaríngea de los ratones con FQ fue una modificación del anteriormente descrito por Coleman y col. (2003). Se usaron ratones FQ o salvajes de seis a doce semanas de edad. Antes de la inoculación, los ratones fueron tratados durante 7 días añadiendo 250  $\mu\text{g/ml}$  de levofloxacino en el agua de bebida y 200  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina durante las últimas 24 h. Tras este tratamiento, se obtuvieron frotis orofaríngeos de los ratones previamente anestesiados (100 mg/kg de ketamina y 10 mg/kg de xylazine) y se sembraron en medio selectivo de *P. aeruginosa* [Agar basal de *Pseudomonas* con un suplemento de C-N (Oxoid, Madrid, España)] para asegurar la eliminación de cualquier otra cepa endógena. En los experimentos de colonización orofaríngea se utilizaron un total de 36 ratones FQ y 36 salvajes divididos en diversos experimentos independientes, cada uno de ellos con 3-8 animales (de cada tipo). Los ratones se expusieron a, aproximadamente,  $5 \times 10^7$  UFC/ml de cultivos en crecimiento exponencial de PAO1 y PAO $\Delta\text{mutS}$ , mezclados en proporción 1:1, en el agua de bebida durante 10 días. En este punto (semana 0) el inóculo se reemplazó por agua estéril y se tomaron frotis orofaríngeos que se sembraron en medio selectivo de *P. aeruginosa* y se incubaron 48 h a 37°C. Adicionalmente, se recogieron lavados broncoalveolares (BALs) anestesiando los ratones. Para ello se utilizó una cánula animal estéril de 25,4 mm 22G (Panlab SL., Barcelona, España) insertándola bajo la glotis dentro de la tráquea y a través de la cual se inyectaron y se volvieron a recolectar 100  $\mu\text{l}$  de suero salino. Se realizaron extensiones de todos los BALs para observar, mediante tinción de

Gram, la posible presencia de marcadores celulares de inflamación de las vías aéreas así como de microorganismos y se sembraron en medio selectivo de *P. aeruginosa* y en agar Sangre (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

En este paso (semana 0), la mitad de los ratones, tanto con FQ como salvajes, fueron tratados con 2 mg/ml de Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) inoculado en el agua de bebida durante 1 semana y cada 4 semanas. Este planteamiento se realizó con el objetivo de evaluar el efecto que tienen los antibióticos de amplio espectro sin actividad antipseudomónica (frecuentemente administrados a niños con FQ para el tratamiento de la colonización/infección por *S. aureus* o *H. influenzae*) en la dinámica de colonización orofaríngea por *P. aeruginosa*.

A partir de este momento se tomaron frotis orofaríngeos y BALs periódicamente en las semanas 1, 4, 8, 12, 16, 20 y 24. A la semana 24 o bien, tras tres muestras negativas consecutivas para *P. aeruginosa*, los ratones se sacrificaban. Se extrajeron los pulmones quirúrgicamente y se recogieron trasudados pulmonares mediante la inoculación de 400 µl de suero salino estéril a través de la tráquea usando una cánula de 25,4 mm 22 G. Se hicieron extensiones de dichos trasudados pulmonares para observar, mediante tinción de Gram, la posible presencia de marcadores celulares de inflamación de las vías respiratorias así como de microorganismos, y se sembraron en medio selectivo de *P. aeruginosa* y en agar Sangre. Adicionalmente se realizaron estudios histopatológicos de los pulmones para comprobar la presencia de infiltrados neutrófilos como marcadores de infección pulmonar en los ratones seleccionados.

Para la discriminación entre las cepas PAO1 y PAO $\Delta$ *mutS* y determinar los IC, se seleccionaron hasta 100 colonias al azar a partir de cada ratón, de cada tipo de muestra y para cada periodo de tiempo y se inocularon en pocillos de microdilución con caldo MH-Km. Además, se comprobaron un número representativo de colonias de cada experimento por el método previamente descrito de disco difusión (basado en la presencia de subpoblaciones mutantes resistentes) para diferenciar cepas hipermutadoras de las no hipermutadoras (Macià y col., 2004).

## 1.6 Tipificación molecular

Finalmente, para descartar la posibilidad de que los ratones se hubiesen colonizado con cepas ambientales de *P. aeruginosa* durante el transcurso del experimento, un aislado de la última muestra positiva de cada ratón se caracterizó por electroforesis de campo pulsado (*pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE).

A partir de los aislados seleccionados se realizaron cultivos *overnight* (37°C, 180 rpm), en 5 ml de infusión cerebro-corazón (*brain heart infusión*, BHI). Se centrifugó 1 ml de cultivo *overnight* (2 minutos a 5000 rpm) y el sedimento se resuspendió en primer lugar, en 1 ml de PIV y a continuación en 200 µl del mismo. Se añadieron 200 µl de agarosa *low melt* al 1,6 % (Bio Rad, La Jolla, EE.UU.) fundida a 42°C, a cada una de las muestras, se homogeneizaron con la pipeta y se introdujeron 200 µl de cada suspensión en el molde de PFGE correspondiente. Los bloques resultantes de la solidificación de la agarosa se incubaron *overnight* a 37°C en tubos con 1 ml de la solución de lisis EC. Al siguiente día, se eliminó la solución EC, se sustituyó por 1 ml de solución ESP y se incubaron los tubos a 50°C durante 16-20 horas. Transcurrido este tiempo, se decantó la solución ESP, y se lavaron los bloques dejándolos a T<sup>a</sup> ambiente durante 30 minutos con 5 ml de TE por tubo. Esta operación de lavado se repitió 4 veces más. Una vez finalizados los lavados, los bloques se conservaron a 4°C hasta su posterior utilización. Para llevar a cabo la restricción del ADN cromosómico, los bloques se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 mm de espesor, se depositaron en tubos eppendorf con 1 ml de agua destilada estéril y se incubaron 10 minutos a 37°C. A continuación, se sustituyó el agua destilada de cada tubo por 200 µl de la mezcla de restricción, y se dejó que ésta actuara durante 16-20 horas a 37°C. El ADN bacteriano embebido en los bloquecillos de agarosa se digirió mediante el enzima de restricción *SpeI*. Como control interno se empleó la cepa de referencia PAO1 y como marcador de peso molecular se utilizó el ADN de la cepa de *E. coli* MG1655 digerido con el enzima *XbaI*. Posteriormente, la mezcla de restricción se reemplazó por 1 ml de TE y se dejó incubar 1 hora a 37°C. Mientras tanto se preparó el gel de PFGE vertiendo en el molde 100 ml de agarosa Megabase (Bio Rad, La Jolla. EE.UU.) al 1% en TBE 0,5X. Una vez solidificado el gel, se

colocaron los fragmentos, con el ADN digerido, en los pocillos y éstos se sellaron con agarosa convencional fundida al 0,8% en TBE 0,5X. La separación del ADN se llevó a cabo en un aparato CHEF-DRIII (Bio-Rad, La Jolla, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones: 6 V/cm<sup>2</sup> durante 26 horas con pulsos de 5 a 40 segundos. Finalmente se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio en concentración 0,5 µg/ml.

Los patrones de macrorestricción del ADN se interpretaron según los criterios establecidos por Tenover y col. (1995).

### **1.7 Análisis estadístico**

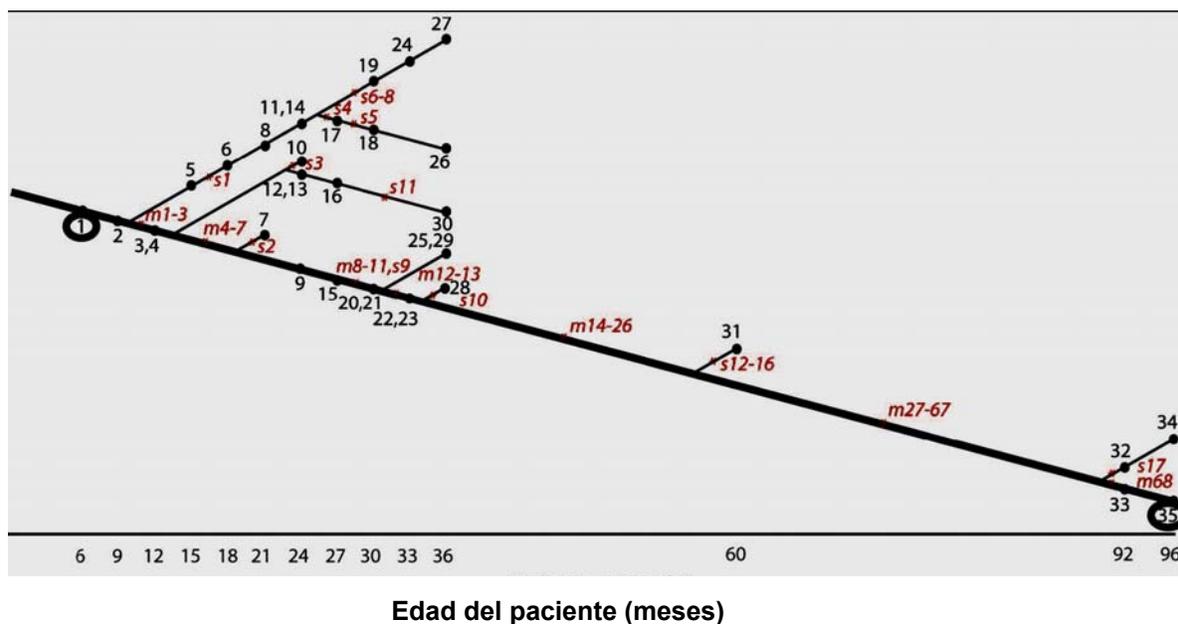
Se utilizó el test exacto de Fischer y el U-test de Mann-Whitney para la comparación de variables categóricas e ICs, respectivamente. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 2 Papel de la hipermutación en la adaptación genética de *P. aeruginosa*: estudio secuencial de la IRC en pacientes FQ.

### 2.1 Cepas bacterianas

Todas las cepas de laboratorio y plásmidos usados o construidos en este trabajo se recogen en las Tablas 5 y 6.

Se utilizó la misma colección de cepas de *P. aeruginosa* de pacientes FQ previamente analizada por Smith y col. (2006). Esta colección incluye 35 aislados seriadados de un único paciente FQ (paciente 1). El genoma completo (6,5MB) tanto del primer aislado (aislado 1, obtenido a los 6 meses de edad) como del último (aislado 35, obtenido a los 96 meses) se secuenció en el trabajo anterior, y las mutaciones detectadas se trazaron en los aislados intermedios, mediante genotipado por PCR (Figura 12).



**Figura 12.** Este árbol muestra las mutaciones producidas en los aislados del paciente 1 durante el desarrollo de la IRC. Los aislados están enumerados en negro (1-35). Los aislados 1 y 35, que presentan un círculo alrededor, corresponden a los aislados de los meses 6 y 96, respectivamente, que habían sido totalmente secuenciados. Las mutaciones se muestran en rojo, las que estaban presentes en el aislado del mes 96 se enumeraron como m1-m68, y las presentes en aislados intermedios como s1- s17 (Figura reproducida de Smith y col., 2006).

La colección además incluía un total de 90 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, obtenidos en serie, de muestras respiratorias de 29 pacientes FQ adicionales (pacientes 2 a 30). Se obtuvieron al menos dos aislados clonales de cada paciente, de manera que, el primer aislado de cada paciente se obtuvo antes de los 11 años y el último >5 años después (en algunos casos hasta 20 años) de recoger el primer aislado. Los aislados fueron clasificados usando un número para la identificación de los pacientes (2 a 30) seguido de la edad en años del paciente cuando se obtuvo la muestra (por ej. 2-6,3). En este grupo de 90 aislados FQ se habían secuenciado un total de 34 genes y sus regiones reguladoras (Smith y col., 2006). Estos 34 genes secuenciados incluían 24 genes que se observó que mutaban en aislados tempranos del paciente 1, y otros 10 genes considerados como candidatos a mutar en muchas infecciones FQ. La lista completa de los genes secuenciados se recoge en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Genes secuenciados en los aislados de los pacientes 2 a 30 por Smith y col. (2006).

Nombre del gen	Nº anotación gen	Función
<i>MexZ</i>	PA2020	Regulador transcripcional de la expresión de bombas de expulsión
<i>LasR</i>	PA1430	Regulador transcripcional del <i>quorum sensing</i>
	PA0313	Probable permeasa de sistema de transporte ABC
<i>MexA</i>	PA0425	Precursor de la bomba de expulsión tipo RND, MexA
<i>AccC</i>	PA4848	Biotin carboxilasa
<i>Vfr</i>	PA0652	Regulador transcripcional
<i>MexS</i>	PA2491	Probable oxidoreductasa
<i>ExsA</i>	PA1713	Regulador transcripcional del sistema de secreción tipo III
	PA0506	Probable acil-CoA deshidrogenasa
<i>WspF</i>	PA3703	Probable metilesterasa relacionada con señales de transducción quimiosensoriales
<i>RpoN</i>	PA4462	Factor $\sigma 54$ de la RNA polimerasa
<i>FleQ</i>	PA1097	Regulador transcripcional de la síntesis del flagelo
<i>MexT</i>	PA2492	Regulador transcripcional de la expresión de bombas de expulsión
<i>NalD</i>	PA3574	Probable regulador transcripcional
<i>AmpD</i>	PA4522	Regulador de la expresión de $\beta$ -lactamasas

	PA0366	Probable aldehído deshidrogenasa
<i>CyaB</i>	PA3217	Adenilato ciclasa
<i>P1-001</i>	Isla genómica de 45 Kb	Proteína hipotética
	PA3817	Probable metiltransferasa
<i>PilB</i>	PA4526	Proteína de biogénesis de fimbrias tipo 4
	PA1333	Proteína hipotética
	PA3565	Probable regulador transcripcional
	PA2312	Probable regulador transcripcional
<i>Anr</i>	PA1544	Regulador transcripcional de metabolismo anaeróbico
<i>RhlR</i>	PA3477	Regulador transcripcional del <i>quorum sensing</i>
<i>PhoP</i>	PA1179	Regulador de respuesta de dos componentes
<i>RhlI</i>	PA3476	Autoinductor de la síntesis de proteínas
	PA4796	Proteína hipotética
<i>PqsB</i>	PA0997	Homólogo de la sintasa de la proteína transportadora de $\beta$ -keto-acil-acil
<i>ToxR</i>	PA0707	Regulador transcripcional
	PA2435	Probable ATPasa tipo P transportadora de cationes
	PA4420	Proteína hipotética
	Ninguna	Proteína hipotética ORF C/SG114
	PA2121	Proteína hipotética

Para cada aislado, se documentó el número total de mutaciones para los 34 genes (Smith y col., 2006). Nosotros documentamos, además, el número de nuevas mutaciones acumuladas por año de infección en los aislados secuenciales, que definimos como el número de mutaciones detectadas en un determinado aislado que no estaban presentes en el aislado isogénico anterior, dividido por el periodo de tiempo (en años) transcurrido entre la obtención de ambos aislados. Por ejemplo, si el aislado 21-10,7 presentaba una 1 mutación en los genes estudiados y el aislado posterior, 21-14,3 presentaba 3 nuevas mutaciones, el tiempo transcurrido entre ambos aislados era de 3.6 años y, por tanto, el número de mutaciones acumuladas/año en el caso del aislado 21-14,3 fue de 0,83.

Tabla 5. Cepas de laboratorio usadas en este trabajo.

Cepas	Genotipo/características relevantes	Referencia
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa de laboratorio completamente secuenciada	Stover y col., 2000
PAOMS	PAO1 $\Delta mutS::lox$	Este trabajo (Mulet y col., 2009)
PAOMA	PAO1 $\Delta mucA::lox$	Este trabajo (Mulet y col., 2009)
PAOMSA	PAO1 $\Delta mutS::lox \Delta mucA::lox$	Este trabajo (Mulet y col., 2009)
<i>E. coli</i>		
XL-1 Blue	F':Tn10 proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lac1 <sup>q</sup> $\Delta(lacZ)M15/ recA1 endA1 gyrA96$ (Nal <sup>r</sup> ) thi hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) mcrB1	Bullock y col., 1987
S17-1	RecA pro (RP4-2Tet::Mu Kan::Tn7)	Simon y col., 1983

Tabla 6. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmidos	Genotipo/características relevantes	Referencia
pEX100Tlink con diana HindIII eliminada	Amp <sup>r</sup> , <i>sacB</i> ; vector de reemplazamiento genético basado en pUC19 con un MCS	Juan y col., 2006
pUCGmlox	Amp <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup> ; vector basado en pUC18 conteniendo el gen <i>aacC1</i> , flanqueado por secuencias <i>lox</i>	Quénéé y col., 2005
pCM157	Tc <sup>r</sup> ; vector de expresión de la recombinasa <i>cre</i>	Marx y Lidstrom, 2002
pEXMA	pEX100Tlink conteniendo la región <i>mucA::lox</i>	Este trabajo (Mulet y col., 2009)
pEXMS	pEX100Tlink conteniendo la región <i>mutS::lox</i>	Este trabajo (Mulet y col., 2009)
pEXMAGm	pEX100Tlink conteniendo la región <i>mucA::Gmlox</i>	Este trabajo (Mulet y col., 2009)
pEXMSGm	pEX100Tlink conteniendo la región <i>mutS::Gmlox</i>	Este trabajo (Mulet y col., 2009)
pUCP24	Gm <sup>r</sup> ; basado en el vector puente pUC18 de <i>Escherichia-Pseudomonas</i>	West y col., 1994
pJMML	<i>mutL</i> de PAO1 clonado en pJMS6 $\alpha$ lac	Oliver y col., 2002[a]
pUCPMS	<i>mutS</i> de PAO1 clonado en pUCP24	Oliver y col., 2004
pUCPML	<i>mutL</i> de PAO1 clonado en pUCP24	Este trabajo

## 2.2 Construcción de mutantes deficientes en los genes *mucA*(PAOMA), *mutS* (PAOMS) y *mucA-mutS* (PAOMSA)

La construcción de estos mutantes se realizó mediante el procedimiento descrito previamente por Quénée y col. (Quénée y col., 2005) para la delección de genes y reciclaje de marcadores de resistencia a antibióticos en *P. aeruginosa*. La Figura 13 muestra un esquema del proceso de construcción de los mutantes.

En primer lugar, se realizaron PCR de la parte inicial y final (PCR1 y PCR2) de cada uno de los genes, *mucA* y *mutS*, pertenecientes al sistema MMR. Los cebadores y las condiciones empleadas para cada una de las PCR se recogen en las Tablas 7 y 8.

Entre la PCR1 y PCR2 de cada gen se dejó sin amplificar un fragmento de 72 pb y 222 pb para los genes *mucA* y *mutS*, respectivamente, para asegurar la inactivación del gen en cada caso. Los productos de PCR (PCR1 y PCR2) se digirieron, una vez purificados, por un lado con BamHI o EcoRI, según correspondiese al fragmento, y con HindIII por el otro y se ligaron entre sí y al plásmido pEX100Tlink, con diana HindIII deleccionada (Juan y col., 2006), digerido con EcoRI y BamHI. Los plásmidos resultantes (pEXMA y pEXMS) se transformaron en *E. coli* XL1 Blue por el método del CaCl<sub>2</sub> (Sambrook y col., 1989) y los transformantes obtenidos se seleccionaron en agar MacConkey con 50µg/ml de ampicilina. Los productos de PCR clonados se secuenciaron para verificar la ausencia de mutaciones generadas durante la amplificación, en especial en el caso del gen *mucA*, para confirmar la ausencia de mutaciones en el gen *algT*.

A continuación los plásmidos (pEXMA y pEXMS), una vez extraídos de los transformantes, se digirieron por separado con HindIII y se ligaron al casete de resistencia a gentamicina (*aacC1*). Este casete, flanqueado por las secuencias *lox*, se obtuvo mediante restricción con HindIII del plásmido pUCGm/*lox* clonado en el único sitio para este enzima formándose por ligación de los dos fragmentos flanqueantes, y los plásmidos resultantes (pEXMAGm y pEXMSGm) fueron transformados en *E. coli* XL1 Blue. Los transformantes se seleccionaron en agar

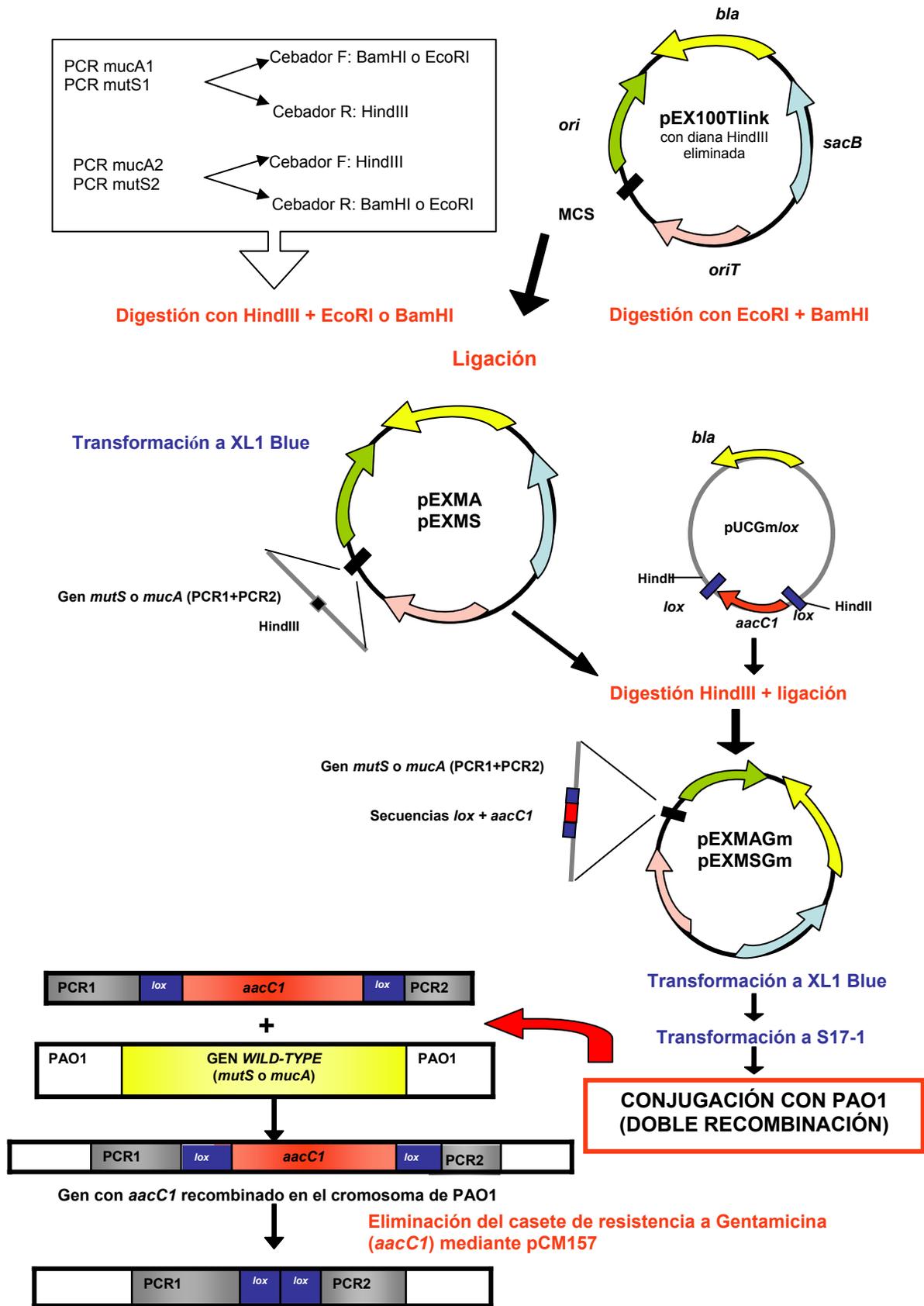


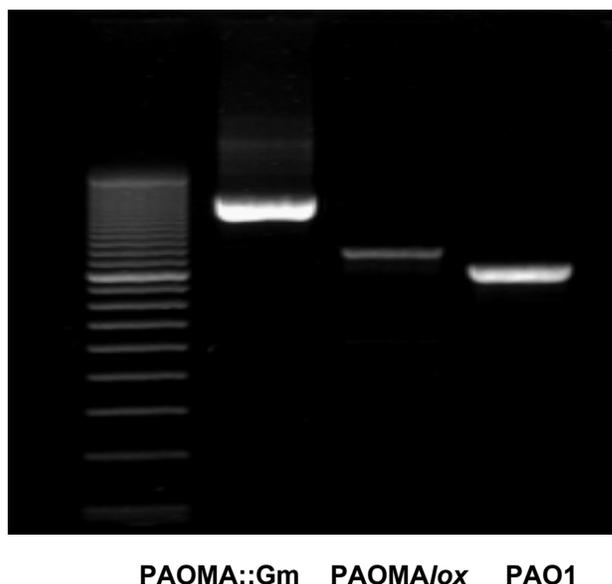
Figura 13. Esquema del proceso de inactivación de los genes *mutS* y *mucA*.

MacConkey con 30µg/ml de ampicilina y 5µg/ml de gentamicina. Estos plásmidos al ser derivados de pEX100Tlink son incapaces de replicarse en *P. aeruginosa* (plásmidos suicida) y además, contienen el gen *sacB* causante de muerte celular en presencia de sacarosa. Por ello, fueron entonces transformados en la cepa coadyuvante de *E. coli* S17-1 por el método del CaCl<sub>2</sub> descrito anteriormente (Sambrook y col., 1989).

Los mutantes finales de PAO1 se obtuvieron mediante un proceso de doble recombinación en un solo paso por conjugación entre las cepas de *E. coli* S17-1, conteniendo los plásmidos pEXMAGm y pEXMSGm por separado, con la PAO1. La conjugación se llevó a cabo añadiendo 5 ml de cultivo en LB con gentamicina (10 µg/ml) y ampicilina (50 µg/ml) de cada transformante de *E. coli* S17-1, en fase exponencial, a 500 µl de cultivo en LB de la PAO1, también en fase exponencial. El conjunto se centrifugó (3000 rpm, 10 minutos), se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en el caldo de LB remanente en el tubo (unos 100 µl) y se extendió a modo de botón en el centro de una placa de agar LB. Transcurridas alrededor de 8 horas de incubación a 37°C, el botón se resuspendió en 1 ml de suero salino 0,9% y se plaqueó en agar LB con un 5% de sacarosa, 30µg/ml de gentamicina y 1µg/ml de cefotaxima. De esta manera se obtuvieron los dobles recombinantes de PAO1, incorporando a su cromosoma el gen correspondiente, en cada caso, con el casete de resistencia a gentamicina insertado y perdiendo el gen *wild type* y el resto del plásmido pEX100Tlink.

Los dobles recombinantes se comprobaron, en primer lugar, mediante la susceptibilidad a ticarcilina por pases consecutivos en placas de agar LB con un 5% de sacarosa, 30µg/ml de gentamicina y 100 µg/ml de ticarcilina en primer lugar, y después, en placas con los mismos componentes pero sin ticarcilina. Los dobles recombinantes no crecieron en el primer tipo de placas al no poseer ya el gen *bla* plasmídico que confiere resistencia a ticarcilina, pero sí lo hicieron en el segundo tipo de placas. Estos dobles recombinantes con su gen correspondiente ya inactivado por la inserción de las secuencias *lox* y el gen *aacC1*, se denominaron como PAOMS::*Gm* y PAOMA::*Gm*. Posteriormente, se llevó a cabo la comprobación mediante amplificación por PCR con los cebadores externos del gen correspondiente, en cada caso (Tablas 7 y 8), con el inserto de *aacC1* más las secuencias *lox*, es decir, un fragmento aproximadamente 1100 pb mayor que el

gen *wild type* (Figura 14).



**Figura 14.** Ejemplo de la PCR de comprobación del mutante PAOMA. En primer lugar se muestra la amplificación del gen *mucA* con el casete de gentamicina insertado de PAOMA::Gm. En segundo lugar amplificación de *mucA* con las secuencias *lox* interrumpiendo el gen de PAOMA/lox. En tercer lugar amplificación de *mucA* de PAO1.

Para la eliminación del casete de resistencia a gentamicina, el plásmido pCM157, que contiene el gen de la recombinasa *cre*, capaz de reconocer y recombinar las secuencias *lox* flanqueantes del casete de resistencia a gentamicina, se electroporó en los diferentes mutantes, tal y como se ha descrito previamente (Smith y col. 1989). El procedimiento de electroporación se detalla más adelante, en el apartado 2.4. En este caso se electroporaron 10  $\mu$ l de plásmido en cada cepa, al no ser éste un plásmido multicopia. Los transformantes se seleccionaron en agar LB con 250 $\mu$ g/ml de tetraciclina. Con el fin de permitir la expresión de la recombinasa *cre* y la eliminación del casete de resistencia a gentamicina, dos transformantes por cada mutante se estiraron en agar LB con 250 $\mu$ g/ml de tetraciclina. El plásmido pCM157 se eliminó de las cepas mediante un pase *overnight* sucesivo en caldo LB. A continuación, se sembró la dilución  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  de cada cultivo en agar LB y se seleccionaron varias colonias para asegurar, mediante susceptibilidad a tetraciclina (250 $\mu$ g/ml) y gentamicina (30 $\mu$ g/ml) y posteriormente mediante amplificación por PCR y secuenciación del DNA, que los

genes correspondientes estaban correctamente interrumpidos (Tabla 8). De esta manera se corroboró la presencia de los respectivos genes inactivados por delección, pero ya sin *aacC1*, sólo con la presencia de las secuencias *lox*, de manera que el fragmento amplificado de cada mutante nulo fue entre 100 y 200 pb mayor que los genes *wild type* de la PAO1 (Figura 14).

El mutante doble (PAOMSA) se construyó a partir de los mutantes simples siguiendo el mismo procedimiento.

Los fenotipos apropiados de los mutantes construidos se comprobaron mediante el fenotipo mucoso (*mucA*) y el incremento, aproximadamente, en 2 log de la tasa de mutación de resistencia a rifampicina (*mutS*).

**Tabla 7.** Cebadores utilizados para la construcción de los mutantes deficientes en *mucA* y *mutS*.

Cebadores	Secuencia (5'-3') <sup>a</sup>	Función
mAF1ERI	TC <u>GAA</u> TTCGACCATCCAGCAGTTGCCCCG	
mAR1HDIII	TCA <u>AGCTT</u> CCATCCGCCACGGTCCCTTC	Inactivación de
mAF2HDIII	TCA <u>AGCTT</u> GACGCCCTGCCGCAAATGGC	<i>mucA</i>
mAR2BHI	TC <u>GGATC</u> CGAACCGCACCATCGCTCTC	
mSF1ERI	TC <u>GAA</u> TTCATGACCGACCTCTCCCAGCAC	
mSR1HDIII	TCA <u>AGCTT</u> CAGGCCCTGTGGCCAGTCG	Inactivación de
mSF2HDIII	TCA <u>AGCTT</u> CTCGATGACACGGTGATCCTC	<i>mutS</i>
mSR2BHI	TC <u>GGATC</u> CAGGAATTGCCCGGCGTTTTTC	

<sup>a</sup>Los lugares de restricción de endonucleasas aparecen subrayados. Las secuencias de los cebadores se obtuvieron del genoma, publicado, de la PAO1 (Stover y col., 2000).

**Tabla 8.** Condiciones de PCR empleadas para la construcción de los mutantes deficientes en *mucA* y *mutS*.

Fragmento amplificado	Condiciones de PCR	Tamaño producto PCR (pb)
PCR1 <i>mutS</i>		555
PCR2 <i>mutS</i>	30'' 94°C, 30'' 66°C, 45'' 72°C) x 10 ciclos	560
PCR1 <i>mucA</i>	+ (30'' 94°C, 60'' 72°C) x 25 ciclos	467
PCR2 <i>mucA</i>		468
<i>mutS</i>	45'' 94°C, 45'' 66°C, 90'' 72°C) x 10 ciclos	1338
<i>mucA</i>	+ (45'' 94°C, 2' 72°C) x 25 ciclos	1007
<i>mutS</i> + secuencias <i>lox</i> + <i>aacC1</i>	60'' 94°C, 60'' 66°C, 2' 72°C) x 10 ciclos +	2216
<i>mucA</i> + secuencias <i>lox</i> + <i>aacC1</i>	(60'' 94°C, 3' 72°C) x 25 ciclos	2035
<i>mutS</i> + secuencias <i>lox</i>	45'' 94°C, 45'' 66°C, 90'' 72°C) x 10 ciclos	1216-1316
<i>mucA</i> + secuencias <i>lox</i>	+ (45'' 94°C, 2' 72°C) x 25 ciclos	1035-1135

### 2.3 Determinación de las frecuencias de mutación

En primer lugar y con el fin de conocer cuáles eran aislados hipermutadores se determinaron las frecuencias de mutación de resistencia a rifampicina (300µg/ml) y/o estreptomina (1000µg/ml), estas últimas sólo en el caso de aquellas cepas que eran resistentes a rifampicina (detectadas únicamente en el paciente 1).

Las frecuencias de mutación fueron determinadas basándose en las técnicas descritas previamente (Oliver y col., 2000), con algunas modificaciones. Para cada cepa, se inocularon en alícuotas independientes, aproximadamente  $10^3$  células en cada uno de 5 tubos con 10 ml de caldo MH, y se incubaron a 37°C y 180 rpm durante 16-18h. Los cultivos se recuperaron por centrifugación y tras resuspenderlos en 1ml de solución salina se realizaron diluciones seriadas 1:10 que se sembraron en placas de agar MH y agar MH suplementado con 300µg/ml de rifampicina (MH-Rif) y/o 1000µg/ml de estreptomina (MH-Str). Tras 36 horas de incubación (48 horas para las cepas de lento crecimiento) se contaron las colonias y se calcularon las frecuencias de mutación como el valor de la mediana del número de mutantes dividido por el valor de la mediana del número total de células. El punto de corte establecido para definir qué cepas eran hipermutadoras fue de una frecuencia de mutación de resistencia a rifampicina  $>2 \times 10^{-7}$ , según recomendaciones previas (Oliver y col., 2000).

A modo de controles, se determinaron las frecuencias de mutación de resistencia a rifampicina y estreptomina en la cepa de referencia PAO1, así como en sus mutantes deficientes en *mucA* (PAOMA), *mutS* (PAOMS) y *mucA-mutS* (PAOMSA). El procedimiento para la construcción de estos mutantes se describe en el apartado anterior (2.2). Para las cepas control se realizaron 3 experimentos independientes para la determinación de las frecuencias de mutación (cada uno de 5 cultivos, como se ha descrito anteriormente), de manera que los resultados se representan como el valor de las medianas  $\pm$  la desviación estándar.

## **2.4 Complementación de las cepas hipermutadoras con los genes *wild-type* del sistema MMR**

### **2.4.1 Construcción del plásmido pUCPML**

Para la construcción del plásmido pUCPML, se obtuvo el gen *mutL wild-type* de la PAO1 a partir del plásmido pJMML (Oliver y col., 2002[a]) mediante restricción con BamHI y se ligó al plásmido pUCP24 abierto mediante el mismo enzima. El producto de ligación se transformó en una cepa de *E. coli* XL<sub>1</sub> Blue mediante el método con CaCl<sub>2</sub> (Sambrook y col., 1989) y los transformantes resultantes se seleccionaron en agar MacConkey con 5µg/ml de gentamicina, y fueron confirmados mediante digestión con BamHI y posteriormente mediante PCR y secuenciación.

### **2.4.2 Estudios de complementación**

Con el fin de explorar las bases genéticas de los fenotipos hipermutadores, se realizaron estudios de complementación en todas las cepas hipermutadoras. Los plásmidos pUCPMS, que produce el gen *mutS wild-type* de la PAO1, pUCPML, que produce el gen *mutL wild-type* de la PAO1, y pUCP24, vector de clonación empleado como control, fueron electroporados en las cepas hipermutadoras tal y como se ha descrito previamente (Smith y col. 1989) y como se resume a continuación.

Para la preparación de las células electrocompetentes, se realizaron cultivos *overnight* (37°C, 180 rpm) de cada uno de los aislados hipermutadores en 10 ml de caldo LB. A continuación, se realizó una dilución 1:50 de los cultivos, con un volumen final de 50ml y se dejaron incubar hasta una densidad óptica, a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,5 (aproximadamente 1x10<sup>8</sup> células/ml). Una vez alcanzada esta DO, los cultivos se mantuvieron en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron a 3000

rpm, a 4° C y durante 15 minutos. A continuación se realizaron una serie de lavados con tampón SMEB en frío, centrifugando en las mismas condiciones, decantando y resuspendiendo en un volumen de tampón cada vez menor, 50ml, 25ml, 5ml y 500µl.

Una vez obtenida esta suspensión de células competentes, se preparó una alícuota de 100µl por cepa a la que se añadieron 5µl del plásmido correspondiente (pUCPMS, pUCPML y pUCP24). La mezcla se mantuvo 10 minutos en hielo. Para la electroporación se utilizó el aparato Gene Pulser X Cell (Bio Rad, La Jolla, EE.UU.) con las siguientes condiciones:  $t = 5$  milisegundos y voltaje = 2,5 KV. Inmediatamente después de la electroporación, se transfirieron los 100µl de las células electroporadas a tubos con 1ml de SOC para incubarlos durante 1 hora (37° C, 180 rpm).

Los transformantes se seleccionaron en placas de agar LB con gentamicina. Las CMI de gentamicina (marcador de resistencia de estos plásmidos) se determinaron por microdilución en cultivo convencional para las cepas hipermutadoras antes de la electroporación y, dependiendo del nivel de resistencia, los transformantes se seleccionaron en agar LB conteniendo 50 o 250 µg/ml de este antibiótico.

La complementación se demostró por la reversión en el incremento de la frecuencia de mutación de resistencia a rifampicina o estreptomina en 2 colonias independientes de transformantes para cada cepa. La complementación se consideró positiva (+) cuando la frecuencia de mutación tras la transformación con pUCPMS o pUCPML disminuyó en  $\geq 2$  log, negativa (-) si la frecuencia de mutación disminuía en  $<1$  log y parcial, si la reducción era, al menos, 1 log pero no llegaba al estado basal.

## **2.5 Amplificación por PCR y secuenciación de los genes MMR**

Los genes *mutS* y/o *mutL* de todas las cepas hipermutadoras fueron amplificados mediante los cebadores mutSF1-mutSR1 o mutLF-mutLR, respectivamente (Tabla 9). Después de purificar (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN, Alemania), los

productos de PCR fueron totalmente secuenciados. Las reacciones de secuenciación se realizaron mediante el BigDye Terminator (PE-Applied Biosystems, USA) y se analizaron mediante el secuenciador ABI Prism 3100 DNA (PE-Applied Biosystems, USA).

Adicionalmente, se amplificaron por PCR y se secuenciaron los alelos *mutS* y/o *mutL* de las cepas no hipermutadoras que precedían o seguían a una cepa hipermutadora. En todos los casos, las mutaciones detectadas se confirmaron mediante la secuenciación de un nuevo producto de PCR. Las secuencias se compararon con las de la cepa de referencia PAO1 mediante el programa informático BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

**Tabla 9.** Cebadores empleados para la amplificación y secuenciación de los genes *mutS* y *mutL*.

Cebadores	Secuencia (5' to 3')	Posición <sup>a</sup>	Uso
mutSF1	TTAACATTACCCTCTTTTGCAC	-50-(-29)	Amplificación y secuenciación del gen <i>mutS</i>
mutSR1	TCATTTTCTAGTTCTCTCCTCA	+2637-2616	
mutSF4	CGCTCCGCTCCAGGACAGCGC	+1611-1633	
mutSF5	CGGCTGCCTGCTCGCCTAC	+701-719	
mutSF6	CATTCGGCGGAGGGCTACCTG	+210-230	
mutSR6	TGGCGGTTTCGCTCATCTCCAC	+2031-2009	
mutSF11	TTCCTGATGGACCTGGAAGCG	+1331-1350	Secuenciación de <i>mutS</i>
mutLF	CGATGATCGCCCAGCGCT	-124-(-107)	Amplificación y secuenciación del gen <i>mutL</i>
mutLR	TCCGCCGGGTCGCGGATA	+2175-2158	
mutLF2	TAGCGCGCCTGACCATGA	+330-347	
mutLF3	GCGCATGGTGC GCGACAA	+797-814	
mutLF4	GCCTCCGGCGGCTCCTCCG	+1178-1197	
mutLR2	GCAGGTCGGCGATGACAT	+1680-1663	

<sup>a</sup> Posición de los números en relación a los codones de inicio de *mutS* o *mutL*.

## 2.6 Tipificación molecular de las cepas

La relación epidemiológica de los aislados secuenciales de los pacientes infectados con cepas hipermutadoras se estudió mediante electroforesis en campo pulsado (PFGE), tal y como se describe en el apartado 1.6., con el fin de determinar la clonalidad entre los aislados hipermutadores y no-hipermutadores de un mismo paciente. Esto permite conocer la persistencia o reemplazamiento de cepas a lo largo del tiempo en un mismo paciente.

La relación de algunos de los aislados con cepas de otras colecciones también se estudió mediante PFGE pero también mediante tipado por MLST (*multilocus sequence typing*). El MLST se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por Curran y col., (2004). Se realizó la amplificación por PCR y posterior secuenciación de los siete genes *housekeeping* *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* y *trpE* utilizando para ello los primers previamente publicados así como la misma mezcla de reacción y condiciones de amplificación para todos ellos, con algunas modificaciones del protocolo de Curran y col. Se analizaron las secuencias de nucleótidos en las dos hebras de cada gen y se compararon con las secuencias existentes en la base de datos de MLST ([www.pubmlst.org/paeruginosa](http://www.pubmlst.org/paeruginosa)) para la asignación del número de alelo correspondiente en cada caso. A cada aislado se le asignó un número según el tipo de secuencia (*sequence type*, ST) de acuerdo con el perfil alélico que presentaba.

## 2.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el test exacto de Fischer, Student *t* test o Mann-Whitney U-test, según correspondiese. Un valor de  $P < 0,05$  se consideró significativo.

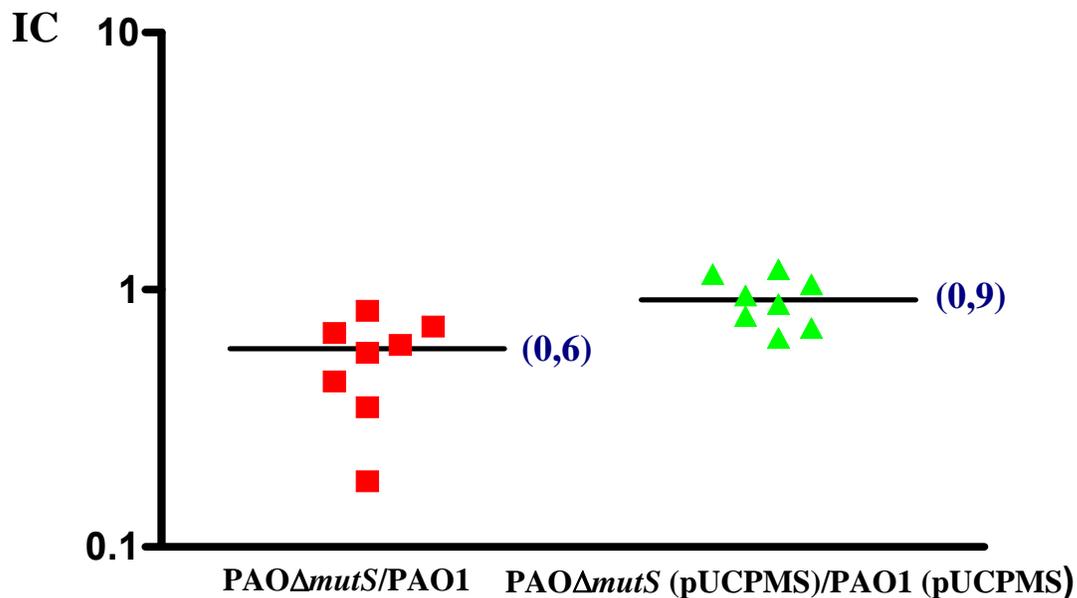
## IV. Resultados



# 1. Efecto de la inactivación del sistema MMR sobre el *fitness*, la virulencia y la persistencia de *P. aeruginosa*: experimentos *in vitro* e *in vivo*

## 1.1 Experimentos de competición *in vitro*

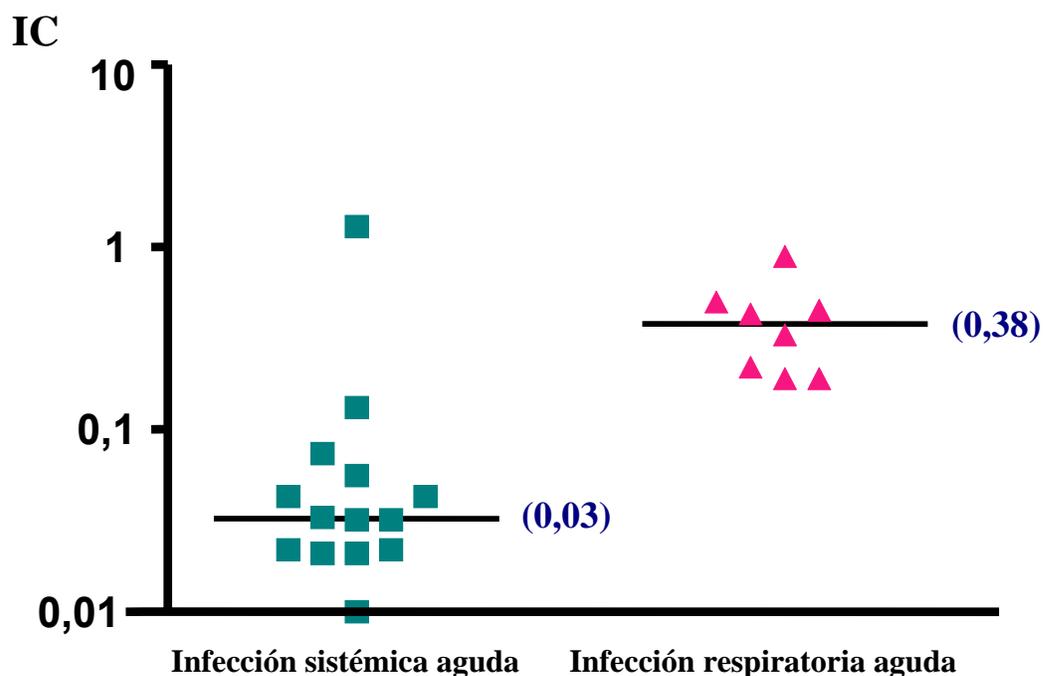
Los experimentos de competición *in vitro* entre PAO $\Delta$ *mutS* y su cepa original *wild-type* PAO1 revelaron que la inactivación del MMR determina una modesta aunque significativa ( $p < 0,001$ ) reducción del *fitness* tal y como se muestra por la mediana del IC=0,6 tras 20 generaciones de crecimiento. Además, los experimentos de competición *in vitro* entre ambas cepas produciendo el plásmido pUCPMS demostraron que el coste biológico estaba realmente determinado por la inactivación de *mutS*, ya que la complementación de PAO $\Delta$ *mutS* con el gen *mutS* *wild-type* prácticamente suprime la reducción del *fitness* (mediana=0,9) (Figura 15).



**Figura 15.** Resultados de los experimentos de competición *in vitro* entre las cepas PAO $\Delta$ *mutS* y PAO1 y entre ambas cepas complementadas con el plásmido que contiene el gen *mutS* *wild-type* (pUCPMS).

## 1.2 Modelos murinos de infección aguda

La inactivación del MMR en PAO $\Delta$ mutS además determinó un coste biológico importante y la reducción de la virulencia en ambos modelos de infección aguda *in vivo*. En el modelo murino de infección sistémica aguda, la mortalidad de los ratones infectados con PAO $\Delta$ mutS (19%) fue significativamente menor ( $p < 0,001$ ) que en los ratones infectados con PAO1 (94%). Además, PAO $\Delta$ mutS fue fuertemente desplazada por la cepa salvaje PAO1 tal y como se muestra por la mediana de los IC=0,03 de las bacterias aisladas en el bazo 24 h tras la inoculación intraperitoneal (Figura 16). En el modelo murino de infección respiratoria aguda, la mortalidad de los ratones infectados con PAO $\Delta$ mutS (37%) fue, así mismo, significativamente más baja ( $p = 0,04$ ) en comparación con los ratones infectados con PAO1 (67%) y PAO $\Delta$ mutS fue claramente desplazada también por PAO1 (mediana IC= 0,38,  $p < 0,001$ ) en las bacterias aisladas de los pulmones a las 48 h tras la inoculación intratraqueal, aunque el efecto fue menos acentuado que en el modelo de infección sistémica (Figura 16).



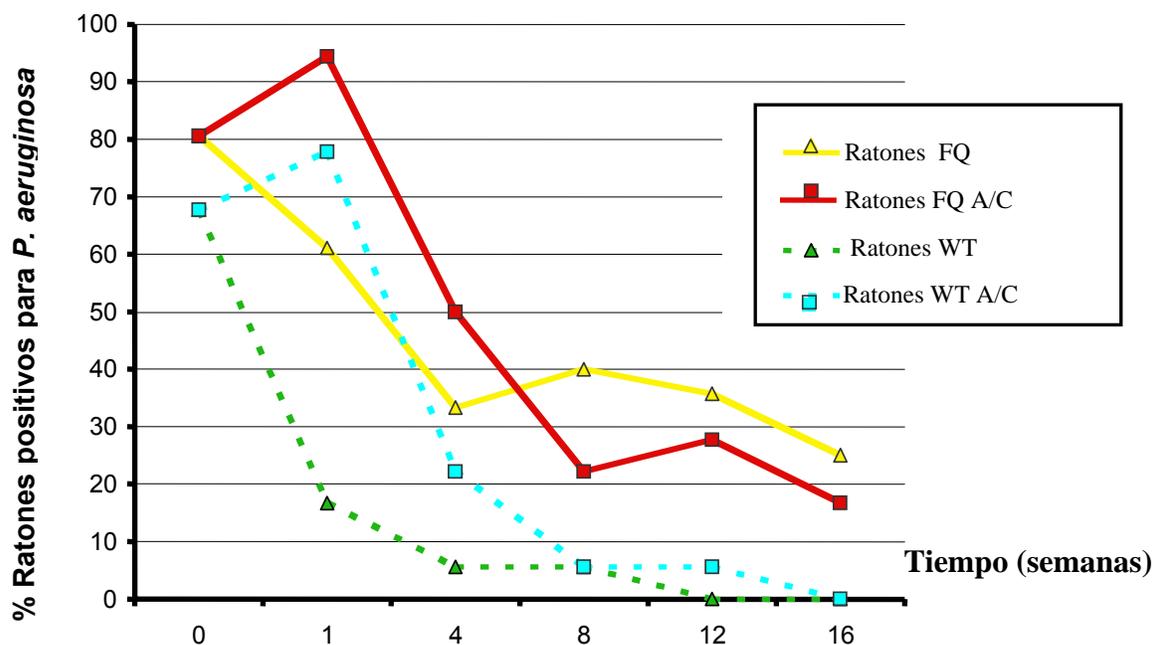
**Figura 16.** Resultados de los experimentos de competición *in vivo* entre las cepas PAO $\Delta$ mutS y PAO1 en modelos de infección sistémica aguda e infección respiratoria aguda en ratones.

### 1.3 Modelo de colonización orofaríngea en ratones FQ

Se observó que la colonización orofaríngea por *P. aeruginosa* estuvo significativamente favorecida en ratones FQ en comparación con los controles *wild-type* (Figura 17). Por ejemplo, el 42% de los ratones FQ estaban todavía colonizados a las 4 semanas en contraste con el 14% de los controles ( $p=0,008$ ) o el 30% a las 8 semanas vs 6% de los controles ( $p=0,007$ ). Similarmente, el tratamiento con Amoxicilina-clavulánico en el agua de bebida favoreció significativamente la colonización inicial (primera semana) en ambos ratones, FQ y salvajes (Figura 17). El 94% de los ratones FQ tratados estaban colonizados en la semana 1 vs el 61% de los ratones FQ no tratados ( $p= 0,02$ ). Esta diferencia fue incluso mucho mayor para los ratones salvajes: 78% vs 17% ( $p<0,001$ ). Sin embargo, las diferencias entre ratones tratados y no tratados desaparecieron tras la semana 4 (Figura 17). En todos los ratones, FQ y salvajes, con cultivos positivos para *P. aeruginosa*, las cepas aisladas fueron identificadas como PAO1/PAO $\Delta$ *mutS* mediante estudios de epidemiología molecular (PFGE), descartando así la posibilidad de colonización eventual por cepas ambientales de *P. aeruginosa*.

Como se muestra en la Figura 15, a pesar de mostrar una mayor susceptibilidad de colonización orofaríngea por *P. aeruginosa* que los ratones salvajes, los ratones FQ tienden a eliminar rápidamente este microorganismo de su orofaringe representado por el extraordinario descenso en el porcentaje de ratones colonizados (por ejemplo sólo un 20 % de los ratones estaban colonizados tras 16 semanas) así como de la carga bacteriana de los ratones positivos.

Además, con este modelo no se consiguió una significativa progresión de colonización crónica de las vías respiratorias bajas: los porcentajes de ratones FQ que mostraron cultivos positivos del BAL fue bajo y disminuían rápidamente (del 39% a la semana 0 al 7% a  $\geq 16$  semanas) y estuvo siempre asociado con una baja carga bacteriana ( $<10^3$  UFC/ml). Es más, tan solo 2 ratones FQ mostraron cultivos positivos para *P. aeruginosa* en los trasudados pulmonares cuando fueron sacrificados 6 meses tras la inoculación.

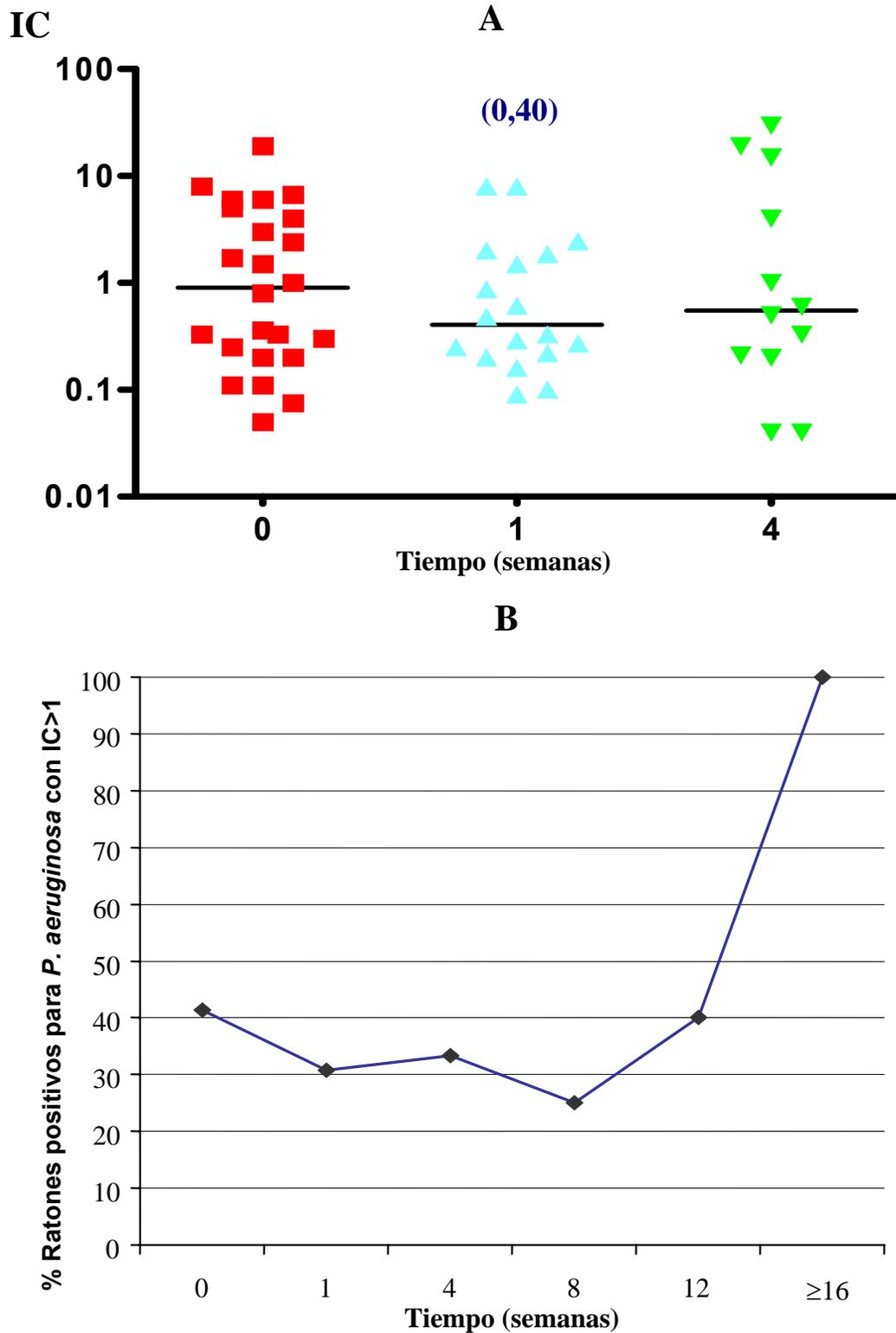


**Figura 17.** Porcentajes de ratones con cultivos positivos para *P. aeruginosa* en los cuatro grupos de ratones estudiados a lo largo del tiempo: ratones FQ y *wild-type* (WT) tratados o no con amoxicilina-clavulánico (A/C).

Los experimentos de competición también revelaron una desventaja inicial en la colonización orofaríngea de los ratones FQ para *PAOΔmutS* con un IC=0,40 a la semana 1 ( $p=0,03$ ) (Figura 18). En contraste con lo que se ha documentado para los modelos de infección aguda, se observó un amplio rango de variación en los IC (desde menos de 0,1 hasta más de 10) para los diferentes ratones (Figura 18A), y tras 4 semanas fue incluso frecuente encontrar sólo una de las cepas en las muestras. Estos resultados junto con los que ya se han descrito muestran una fuerte presión selectiva para la eliminación de *P. aeruginosa*. La desventaja de *PAOΔmutS* continuó aumentando hasta la semana 8, cuando en el 75% de los ratones positivos para *P. aeruginosa*, *PAO1* fue la cepa dominante (Figura 18B). Sin embargo, de ahí en adelante, la tendencia se invirtió, y en todos los ratones FQ positivos tras  $\geq 16$  semanas (20%), *PAOΔmutS* fue la cepa dominante ( $p=0,01$ ) (Figura 18B). De los 6 ratones FQ que mostraban cultivos positivos para *P. aeruginosa* tras 16 semanas, *PAO1* no se detectó en 2 de ellos (sólo se detectó

PAO $\Delta$ *mutS*), mientras que para los otros cuatro el rango de los IC iba de 2,2 a 48, mostrando una clara selección positiva de cepas hipermutadoras durante la colonización orofaríngea a largo plazo en ratones FQ.

Con el objeto de conocer si la selección de estirpes hipermutadoras durante la persistencia a largo plazo en la orofaringe de los ratones FQ era debida a su co-selección con mutaciones que mejorarían su capacidad de colonización orofaríngea, se realizaron experimentos de competición usando el mismo modelo con 3 cepas diferentes de PAO $\Delta$ *mutS* recogidas de ratones FQ entre las semanas 16 y 24 tras la inoculación, y la cepa salvaje PAO1. Los resultados de estos experimentos de competición mostraron que las estirpes persistentes de PAO $\Delta$ *mutS* inicialmente no tenían un potencial mayor de colonización orofaríngea, sino más bien al contrario, ya que en todos los casos fueron claramente desplazadas por PAO1 durante la colonización inicial mostrando una mediana de IC=0,3 una semana tras la inoculación.



**Figura 18** Resultados de los experimentos de competición *in vivo* entre las cepas PAO $\Delta$ *mutS* y PAO1 en el modelo de colonización orofaríngea en ratones FQ. **A.** Índices de competición (IC) por tiempo transcurrido. **B.** Porcentajes de ratones FQ con cultivos positivos para *P. aeruginosa* en los que PAO $\Delta$ *mutS* desplaza a PAO1 (IC>1) por tiempo.

## 2. Papel de la hipermutación en la adaptación genética de *P. aeruginosa*: estudio secuencial de la IRC en pacientes FQ.

### 2.1 Prevalencia y naturaleza de las cepas hipermutadoras

Como ya se ha comentado anteriormente, en este trabajo se analizó una colección de aislados de *P. aeruginosa* de pacientes FQ previamente caracterizada por Smith y col. (2006). Esta colección incluye 35 aislados longitudinales de un paciente FQ (paciente 1). El primer aislado (aislado 1, obtenido a los 6 meses) y el último (aislado 35, obtenido a los 96 meses) fueron totalmente secuenciados (6,5MB), y las mutaciones detectadas, se trazaron en los aislados intermedios mediante genotipaje basado en PCR (Smith y col., 2006).

En el trabajo previo se observó que el aislado 35 (96 meses) poseía una mutación no sinónima en *mutS* (R490L), pero no se evaluó la hipermutabilidad debido a que la cepa era resistente a rifampicina. Con el objetivo de determinar si este último aislado, completamente secuenciado, era hipermutador, en este trabajo se determinaron las frecuencias de mutación de resistencia a estreptomycin en los aislados 1 y 35 y se compararon los resultados con los de las cepas control. Como se muestra en la Tabla 10, el aislado 35 mostró una frecuencia de mutación 2 log mayor que la del aislado 1. Además, las frecuencias de mutación de resistencia a estreptomycin de los aislados 1 y 35 fueron muy similares a las de los controles, *wild-type* y deficiente en *mutS*, respectivamente (Tabla 10). La elevada frecuencia de mutación se revirtió mediante complementación con el plásmido productor del gen *mutS wild-type*, demostrando que el aislado 35 era realmente hipermutador, y además que la sustitución R490L, que afecta al dominio IV, de unión a ADN, de MutS (Lamers y col., 2000), da lugar a una proteína MutS no funcional. Como cabía esperar, los aislados previos, 32-34, que también contenían la sustitución R490L, mostraron elevadas frecuencias de mutación, mientras que el último aislado que no presentaba la mutación (aislado 30, mes 60) presentaba unas frecuencias de mutación basales.

**Tabla 10.** Frecuencias de mutación de resistencia a estreptomycin y complementación con pUCPMS de los aislados del paciente 1.

Cepas	Frecuencias de mutación de resistencia a estreptomycin (1000 µg/ml)	Complementación con pUCPMS <sup>a</sup>
PAO1	9,1± 2,6 x10 <sup>-10</sup>	
PAOMA <sup>b</sup>	5,6±0,6 x10 <sup>-10</sup>	
PAOMS <sup>b</sup>	1,2± 0,7 x10 <sup>-7</sup>	+
PAOMSA <sup>b</sup>	2±0,2 x10 <sup>-7</sup>	+
Paciente 1-0.5 (6 meses)	9,8x10 <sup>-10</sup>	
Paciente 1-8 (96 meses)	7,6x10 <sup>-8</sup>	+

<sup>a</sup>La complementación se consideró positiva (+) cuando la frecuencia de mutación tras la transformación de pUCPMS disminuía  $\geq 2$  log.

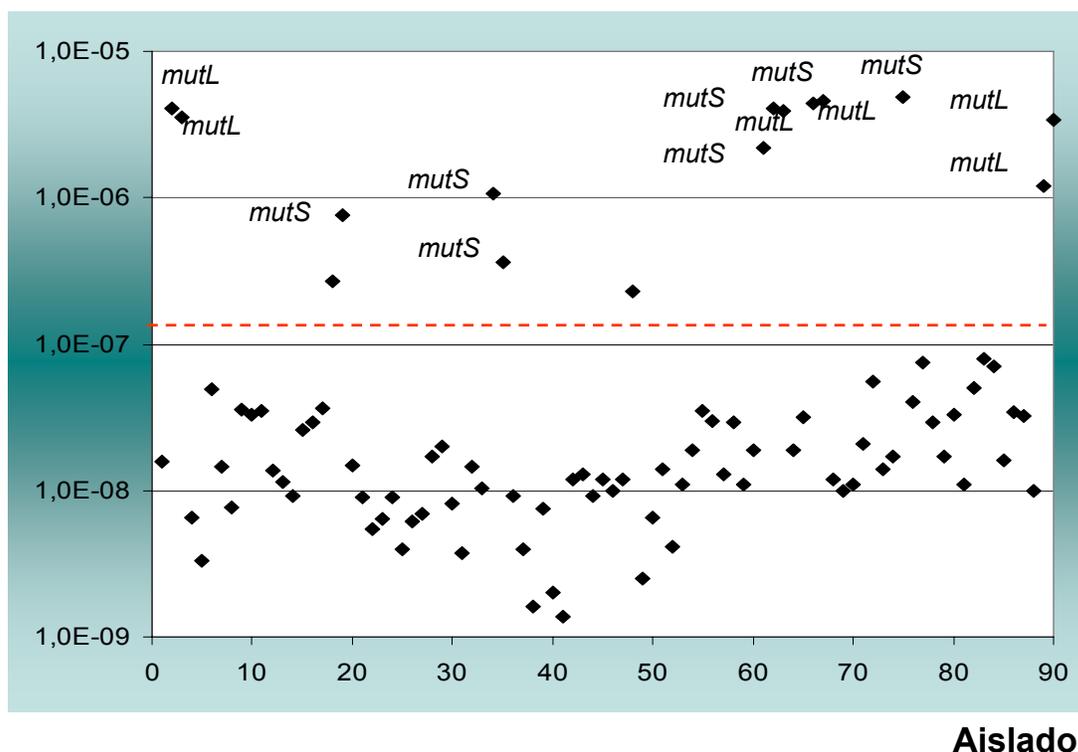
<sup>b</sup>PAOMA (mutante *mucA* de PAO1), PAOMS (mutante *mutS* de PAO1), PAOMSA (mutante *mutS-mucA* de PAO1).

Continuando con la caracterización de la colección de cepas de Smith y col. (Smith y col., 2006), ésta incluía además, un total de 90 aislados clínicos de *P. aeruginosa*, obtenidos longitudinalmente de muestras de esputo de 29 pacientes adicionales (pacientes 2-30). Había, por lo menos, dos aislados clonales de cada paciente, de manera que el primer aislado se recogió antes de los 11 años de edad y el último >5 años (en algún caso hasta 20 años) después de la recogida del primer aislado. Como ya se ha comentado anteriormente, en este grupo de 90 aislados FQ se secuenciaron totalmente 34 genes y sus regiones reguladoras (Smith y col., 2006) (Tabla 4, materiales y métodos). Dado que todos los aislados presentaban susceptibilidad a rifampicina, se estudiaron las frecuencias de mutación de resistencia a este antibiótico en los 90 aislados.

Tal y como se muestra en la Figura 19, el análisis de las frecuencias de mutación reveló la presencia de 15 (16,7%) cepas hipermutadoras, según el punto de corte establecido ( $>2 \times 10^{-7}$ ). Los aislados hipermutadores se detectaron en 9 de los 29

pacientes (31%); en 2 de ellos (6,9%), las cepas hipermutadoras se detectaron en los aislados más tempranos, es decir, al inicio de la infección pulmonar, mientras que en los 7 pacientes restantes (24,1%), los mutantes emergieron durante el desarrollo de la IRC.

### Frecuencia



**Figura 19.** Distribución de las frecuencias de mutación de resistencia a rifampicina en la colección de 90 aislados de *P. aeruginosa* de los pacientes FQ 2 a 30. Se indican los aislados deficientes en *mutS* o *mutL*. La línea intermitente roja corresponde al punto de corte establecido de frecuencia de mutación para identificar a las cepas hipermutadoras ( $>2 \times 10^{-7}$ ).

La relación genética de los aislados secuenciales se estudió mediante PFGE. En los 7 casos en los que los mutantes emergieron durante el curso de la infección crónica, los aislados hipermutadores y sus aislados no hipermutadores precedentes mostraron el mismo patrón de macrorestricción. En otro de los pacientes (paciente 8) el primer y el último aislado presentaban un fenotipo hipermutador y el mismo patrón de PFGE. Por último, en el único paciente (paciente 23) que presentaba aislados no hipermutadores secuenciales

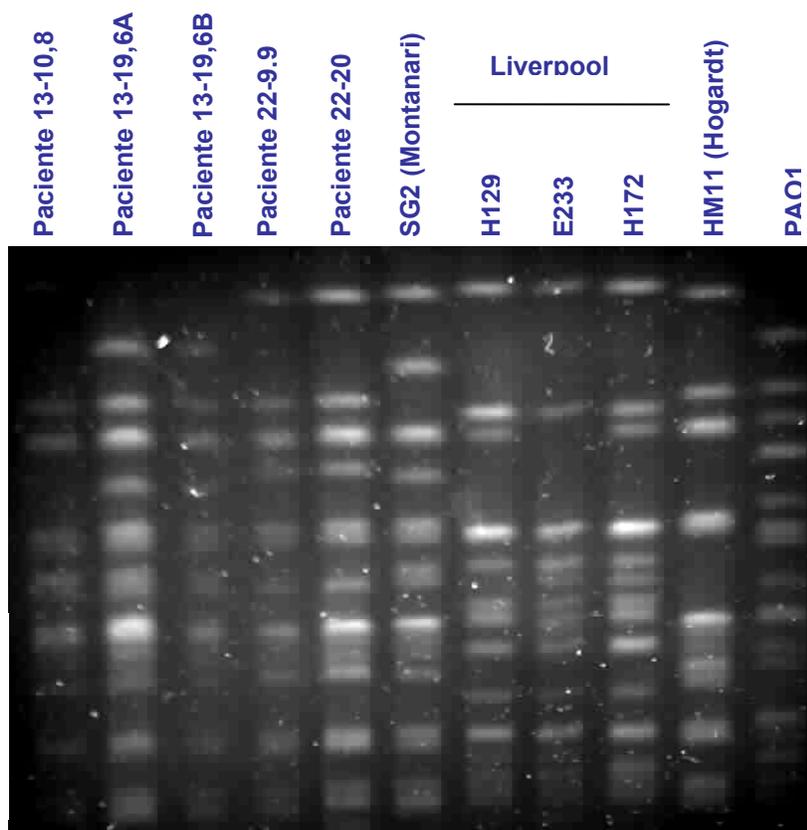
posteriores a un aislado hipermutador, también presentaban el mismo patrón de macrorestricción. Estos resultados sugieren que la transición del fenotipo no hipermutador a hipermutador (y viceversa) es una consecuencia de eventos mutacionales y no de reemplazamiento de cepas.

Las bases genéticas para la hipermutabilidad de todos los aislados hipermutadores de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes FQ se investigó mediante estudios de complementación y secuenciación de genes del sistema MMR. Los principales resultados se muestran en la Tabla 11, y el perfil completo de los alelos de los genes del sistema MMR se muestra detalladamente en la Tabla 12.

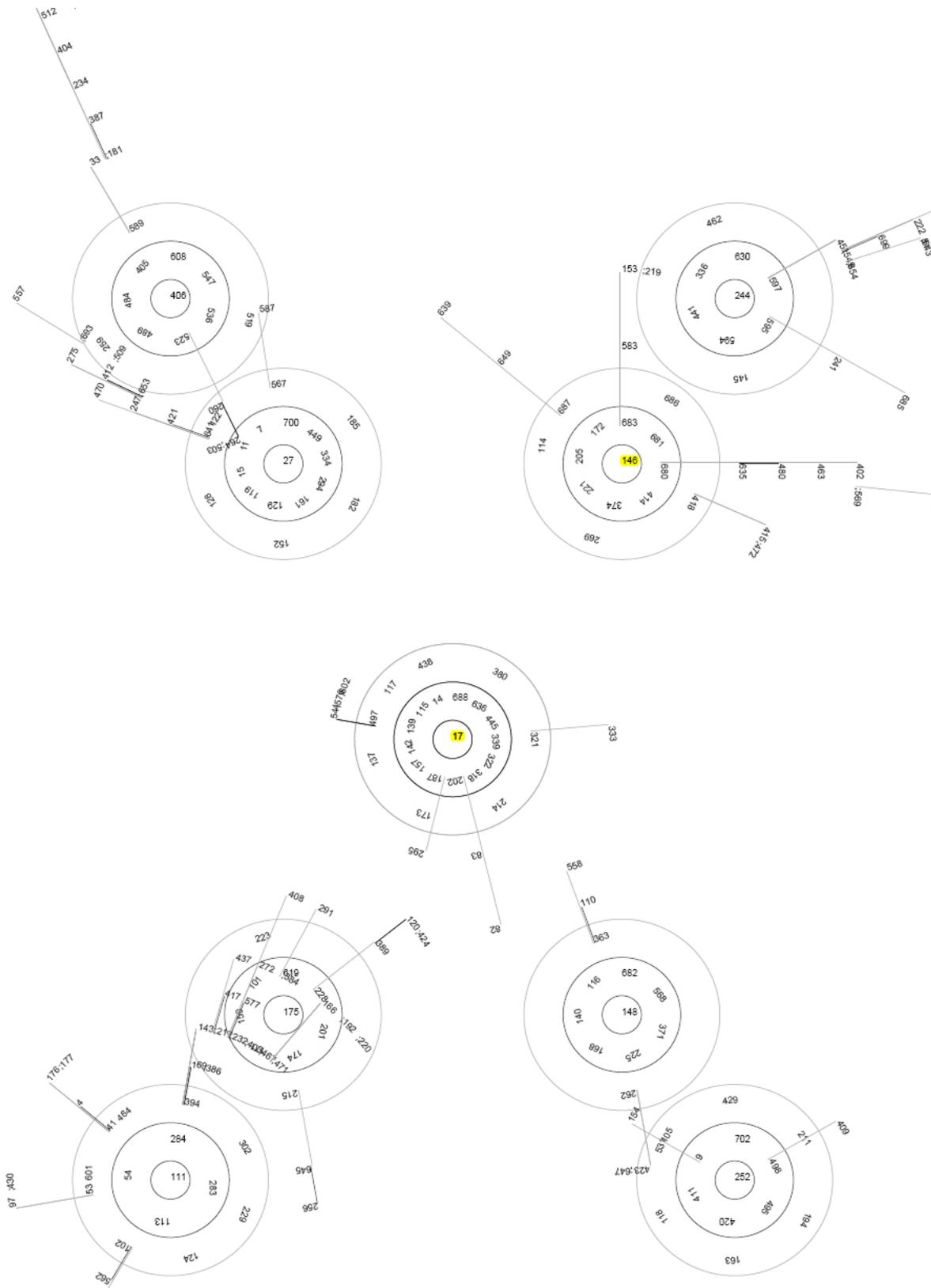
Trece de las 15 (86,6%) cepas hipermutadoras resultaron ser defectivas en *mutS* (7 aislados) o *mutL* (6 aislados). Tal y como se muestra en la Tabla 11, en muchos casos (11 de 13), los aislados hipermutadores deficientes en el sistema MMR poseen mutaciones directamente inactivantes (cambios en el marco de lectura o codones stop) en *mutS* o *mutL*. Tal y como se podría esperar, en todos los casos, la secuenciación de los aislados no hipermutadores que preceden o siguen a los aislados hipermutadores revelaron la presencia de alelos *mutS* o *mutL* idénticos, excepto en la mutación inactivante. En los 2 aislados restantes (21-19,5 y 22-20), las responsables del fenotipo hipermutador (Tabla 11) fueron mutaciones de cambio de sentido. El aislado 22-20, deficiente en *mutS*, contenía dos sustituciones no sinónimas en *mutS*, A187S y R306C, aunque la primera se detectó también en los aislados isogénicos previos no hipermutadores. Estos resultados demuestran que la sustitución R306C, no descrita antes y que implica cambios en un residuo altamente conservado localizado en el dominio IV de unión a DNA (Lamers y col., 2000), debe ser la principal responsable de la inactivación de MutS en esta cepa.

Por otra parte, la sustitución A187S, que encontramos tanto en los aislados isogénicos hipermutadores como no hipermutadores, ha sido descrita con anterioridad como una mutación inactivante de *mutS* y responsable, por lo tanto, del fenotipo hipermutador (Hogardt y col., 2006). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que no se trata de una mutación inactivante. De hecho, la sustitución A187S se encontró también en el aislado isogénico no hipermutador previo al

aislado 13-19, deficiente en *mutS* (4 pb de inserción) (Tabla 11). Este polimorfismo se ha descrito frecuentemente en aislados hipermutadores en varias colecciones diferentes, incluyendo la cepa epidémica de Liverpool (Hogardt y col., 2006; Kenna y col., 2007; Montanari y col., 2007). Con el fin de determinar si se trata de una cepa ampliamente extendida que contiene este polimorfismo o bien, si simplemente se trata de un polimorfismo que aparece frecuentemente en *P. aeruginosa*, decidimos analizar la relación clonal entre las diferentes cepas descritas mediante PFGE (Figura 20) y análisis mediante MLST (Figura 21) para *P. aeruginosa*. Ambas técnicas demostraron que los aislados de la colección norteamericana de Smith y col. (2006) que poseen la sustitución A187S pertenecen al mismo complejo clonal que las cepas alemanas descritas por Hogardt y Montanari (ST 17), mientras que la cepa de Liverpool pertenece a un clon diferente (ST 146). Además, al secuenciar dos cepas isogénicas no hipermutadoras pertenecientes al clon de Liverpool pudimos observar que éstas también poseían la sustitución A187S. Estos datos, parecen indicar, por lo tanto, que la sustitución A187S es simplemente un polimorfismo no inactivante presente en clones ampliamente diseminados como son el clon de Liverpool o el ST17 (Curran y col., 2004).



**Figura 20.** PFGE con los patrones de macrorestricción de los aislados comparados con la sustitución A187S en el gen *mutS*.



**Figura 21.** Representación mediante eBURST de los complejos clonales. Como se puede observar, el ST17 y el ST146 pertenecen a diferentes complejos clonales, siendo ambos clones consenso de su respectivo complejo clonal.

Continuando con el análisis, los resultados del paciente 21 son particularmente interesantes. Los aislados no hipermutadores tempranos (21-0,5 y 21-10,7) estaban seguidos por dos aislados secuenciales deficientes en *mutS* (21-14,3 y 21-15,2) y un aislado final deficiente en *mutL* (21-19,5) (Tabla 11). Se comprobó, mediante PFGE, que todos los aislados eran isogénicos sugiriendo esto la selección de dos líneas independientes de mutantes deficientes en el sistema MMR durante el desarrollo de la IRC. Curiosamente, el aislado 21-19,5 contenía dos mutaciones de cambio de sentido en *mutL*, ninguna de ellas presente en los aislados previos, a pesar de que el resto del perfil alélico estaba conservado (Tabla 12). Parece poco probable que fuese necesaria la adquisición de ambas mutaciones de cambio de sentido para la inactivación de MutL, ya que existen cientos de mutaciones inactivantes posibles que se dan en un solo paso. Una explicación más probable podría ser que una de las mutaciones, que inactiva MutL, fuese seleccionada primero, y que la segunda, se seleccionase posteriormente en el mutante como mutación compensatoria para restaurar la posibilidad de un efecto deletéreo de la primera mutación.

La aparición de dos genotipos hipermutadores independientes, aparentemente, también ocurrió en el caso del paciente 8, en el que un aislado hipermutador débil (*weak mutator*) (no deficiente en MMR) era seguido secuencialmente por una cepa isogénica deficiente en *mutS* (Tabla 11).

**Tabla 11.** Resultados de las frecuencias de mutación, estudios de complementación y secuenciación de los genes MMR en los aislados hipermutadores de los pacientes FQ 2 a 30.

Aislados	Frecuencia de mutación de resistencia a rifampicina (300 µg/ml)	Complementación <sup>a</sup>		Secuenciación de los genes MMR <sup>b</sup>
		<i>mutS</i> (pUCPMS)	<i>mutL</i> (pUCPML)	
PAO1	2,4 ± 1,3 x 10 <sup>-8</sup>			
PAOMS	4,0 ± 1,2 x 10 <sup>-6</sup>	+		
PAOMA	1,1 ± 0,2 x 10 <sup>-8</sup>			
PAOMSA	3,1 ± 1,0 x 10 <sup>-6</sup>	+		
Paciente 2-12,8	4,1 x 10 <sup>-6</sup>	-	+	<i>mutL</i> : inserción de 2pb (CG) en nt 1822
Paciente 2-13	3,6 x 10 <sup>-6</sup>	-	+	<i>mutL</i> : inserción de 2pb (CG) en nt 1822
Paciente 8-1,1	2,7 x 10 <sup>-7</sup>	-	-	<i>MutS</i> : wild-type <i>MutL</i> : G427S
Paciente 8-13,2A	7,6 x 10 <sup>-7</sup>	NR	NR	<i>mutS</i> : delección de 4pb (CGAG) en nt 1761 <i>MutL</i> : G427S
Paciente 13-19,6A	1,1 x 10 <sup>-6</sup>	+	-	<i>MutS</i> : A187S <i>mutS</i> : inserción de 4pb (CGCC) en nt 1600
Paciente 13-19,6B	3,7 x 10 <sup>-7</sup>	+	-	<i>MutS</i> : A187S <i>mutS</i> : inserción de 4pb (CGCC) en nt 1600
Paciente 17-22,2	2,3 x 10 <sup>-7</sup>	-	-	<i>mutS</i> : wild-type <i>mutL</i> : wild-type
Paciente 21-14,3	2,2 x 10 <sup>-6</sup>	+	-	<i>mutS</i> : delección de 1pb (T) en nt 2437 <i>mutL</i> : wild-type

Aislados	Frecuencia de mutación de resistencia a rifampicina (300 µg/ml)	Complementación <sup>a</sup>		Secuenciación de los genes MMR <sup>b</sup>
		<i>mutS</i> (pUCPMS)	<i>mutL</i> (pUCPML)	
Paciente 21-15,2	4,1 x 10 <sup>-6</sup>	+	-	<i>mutS</i> : <b>delección de 1pb (T) en nt 2437</b> <i>mutL</i> : <i>wild-type</i>
Paciente 21-19,5	3,9 x 10 <sup>-6</sup>	-	+	<i>mutS</i> : <i>wild-type</i> <i>MutL</i> : <b>T118A, A124V</b>
Paciente 22-20	4,4 x 10 <sup>-6</sup>	+	-	<i>MutS</i> : <b>A187S, R306C</b>
Paciente 23-6,2	4,6 x 10 <sup>-6</sup>	-	+	<i>MutL</i> : <b>Q492X</b>
Paciente 25-21	4,9 x 10 <sup>-6</sup>	+	-	<i>mutS</i> : <b>delección de 1pb (A) en nt 2428</b>
Paciente 30-16,8	1,2 x 10 <sup>-6</sup>	-	+	<i>mutL</i> : <b>inserción de 1pb (C) en nt 100</b>
Paciente 30-18,5	3,4 x 10 <sup>-6</sup>	-	+	<i>mutL</i> : <b>inserción de 1pb (C) en nt 100</b>

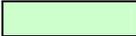
<sup>a</sup>La complementación se consideró positiva cuando la frecuencia de mutación tras la inserción de pUCPMS o pUCPML se redujo en >2 log; negativa cuando la frecuencia de mutación se redujo <1 log y parcial si la reducción era al menos de 1 log pero sin llegar al nivel basal. En uno de los casos fue imposible realizar la complementación (NR) debido al alto nivel de resistencia a gentamicina de la cepa clínica.

<sup>b</sup>Las supuestas mutaciones inactivantes se muestran en negrita.

**Tabla 12a.** Polimorfismos y mutaciones documentadas en *mutS* de aislados FQ seleccionados comparados con la PAO1

Posición del aminoácido	Posición del nucleótido	Codon de la PAO1	Aminoácido	8-1,1	8-13,2-A	13-10,8	13-19,6-A	13-19,6-B	17-22,2	21-14,3	21-15,2	21-19,5	22-9,9	22-20	25-21
5	15	TCC	Ser			TCT	TCT	TCT					TCT	TCT	
9	27	CCG	Pro			CCA	CCA	CCA					CCA	CCA	
46	138	AAA	Lys			AAG	AAG	AAG					AAG	AAG	
54	162	GCA	Ala			GCG	GCG	GCG					GCG	GCG	
72	216	TCG	Ser	TCC	TCC	TCC	TCC	TCC		TCC	TCC	TCC	TCC	TCC	TCC
95	285	GAC	Asp						GAT						
96	288	CCG	Pro												CCA
112	336	ACC	Thr						ACT						
114	342	GGC	Gly						GGT						
119	357	GAG	Glu						GAA						
178	534	CCA	Pro	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC	CCC
187	559	GCG	Ala			TCG(Ser)	TCG(Ser)	TCG(Ser)					TCG(Ser)	TCG(Ser)	
291	873	GTG	Val						GTA						
306	916	CGC	Arg												TGC(Cys)
312	934	TTG	Leu			CTG	CTG	CTG	CTG				CTG	CTG	
430	1290	GCC	Ala						GCG						

Posición del aminoácido	Posición del nucleótido	Codon de la PAO1	Aminoácido	8-1,1	8-13,2-A	13-10,8	13-19,6-A	13-19,6-B	17-22,2	21-14,3	21-15,2	21-19,5	22-9,9	22-20	25-21
435	1305	CTG	Leu						CTA						
446	1338	CTG	Leu			CTT	CTT	CTT					CTT	CTT	
479	1437	GTG	Val			GTA	GTA	GTA	GTA				GTA	GTA	
484	1452	GCG	Ala			GCT	GCT	GCT	GCT				GCT	GCT	
	1600					4pb ins.(CGCC)		4pb ins.(CGCC)							
569	1707	CCG	Pro	CCA	CCA										
581	1743	CAG	Gln			CAA	CAA	CAA	CAA	CAA	CAA	CAA	CAA	CAA	CAA
	1761					4pb del(CGAG)									
618	1854	GGT	Gly							GGC	GGC	GGC			GGC
	2428														1pb del. (A)
	2437									1pb del. (T) 1pb del.(T)					

 No hipermutador  
 Hipermutador, complementación con pUCPMS negativa  
 Hipermutador, complementación con pUCPMS positiva

**Tabla 12b.** Polimorfismos y mutaciones documentadas en *mutL* de aislados FQ seleccionados comparados con la PAO1

Posición del aminoácido	Posición del nucleótido	Codon de la PAO1	Aminoácido	2-12.8	2-13.0	8-1.1	8-13.2-A	17-22.2	21-14.3	21-15.2	21-19.5	23-6.2	30-16.8	30-18.5
	100												1 bp ins. (C)	1 bp ins. (C)
46	138	ATT	Ile										ATC	ATC
47	141	GAT	Asp										GAC	GAC
97	291	GGA	Gly	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC
107	321	AGC	Ser	AGT	AGT	AGT	AGT					AGT		
118	352	ACC	Thr									GCC (Ala)		
121	363	GCC	Ala										GCT	GCT
124	371	GCC	Ala									GTC (Val)		
132	396	CGC	Arg	CGT	CGT	CGT	CGT		CGT	CGT	CGT	CGT		
157	471	AAC	Asn										AAT	AAT
164	492	TTC	Phe	TTT	TTT							TTT		
166	498	CGT	Arg			CGC	CGC							
177	531	GAG	Glu			GAA	GAA						GAA	GAA
186	558	CGC	Arg			CGT	CGT						CGT	CGT
203	607	CTG	Leu						TTG	TTG	TTG			
237	711	GGC	Gly										GGT	GGT
242	726	GGC	Gly			GGT	GGT							
288	864	CAT											CAC	CAC
329	985	CTG	Leu			TTG	TTG						TTG	TTG
345	1035	CCC	Pro	CCG	CCG							CCG		
354	1062	CGT	Arg										CGA	CGA
372	1116	GCC	Ala										GCT	GCT
389	1167	TCA	Ser										TCG	TCG

Posición del aminoácido	Posición del nucleótido	Codon de la PAO1	Aminoácido	2-12.8	2-13.0	8-1.1	8-13.2-A	17-22.2	21-14.3	21-15.2	21-19.5	23-6.2	30-16.8	30-18.5
401	1203	TAT	Tyr										TAC	TAC
408	1224	CCC	Pro										CCT	CCT
427	1279	GGC	Gly			AGC (Ser)	AGC (Ser)							
436	1308	AGT	Ser	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC
455	1365	ATT	Ile	ATC	ATC								ATC	ATC
473	1419	GAG	Glu										GAA	GAA
492	1474	CAG											TAG (Stop)	
544	1632	GCG	Ala			GCT	GCT	GCT						
559	1677	GAA	Glu										GAG	GAG
563	1689	AGT	Ser	AGC	AGC	AGC	AGC	AGC				AGC	AGC	AGC
568	1704	GCG	Ala										GCA	GCA
573	1717	CTG	Leu	TTG	TTG	TTG	TTG					TTG	TTG	TTG
581	1743	GGC	Gly	GGT	GGT	GGT	GGT					GGT		
591	1771	TTG	Leu	CTG	CTG	CTG	CTG		CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG
605	1815	GAA	Glu	GAG	GAG	GAG	GAG		GAG	GAG	GAG	GAG		
606	1818	CGC	Arg			CGT	CGT							
	1822			2 pb ins. (CG)		2 pb ins. (CG)								
619	1857	CAG	Gln	CAA	CAA	CAA	CAA		CAA	CAA	CAA	CAA	CAA	CAA
620	1858	TTG	Leu	CTG	CTG	CTG	CTG		CTG	CTG	CTG	CTG	CTG	CTG

	No hipermutador
	Hipermutador, complementación con pUCPML negativa
	Hipermutador, complementación con pUCPM positiva

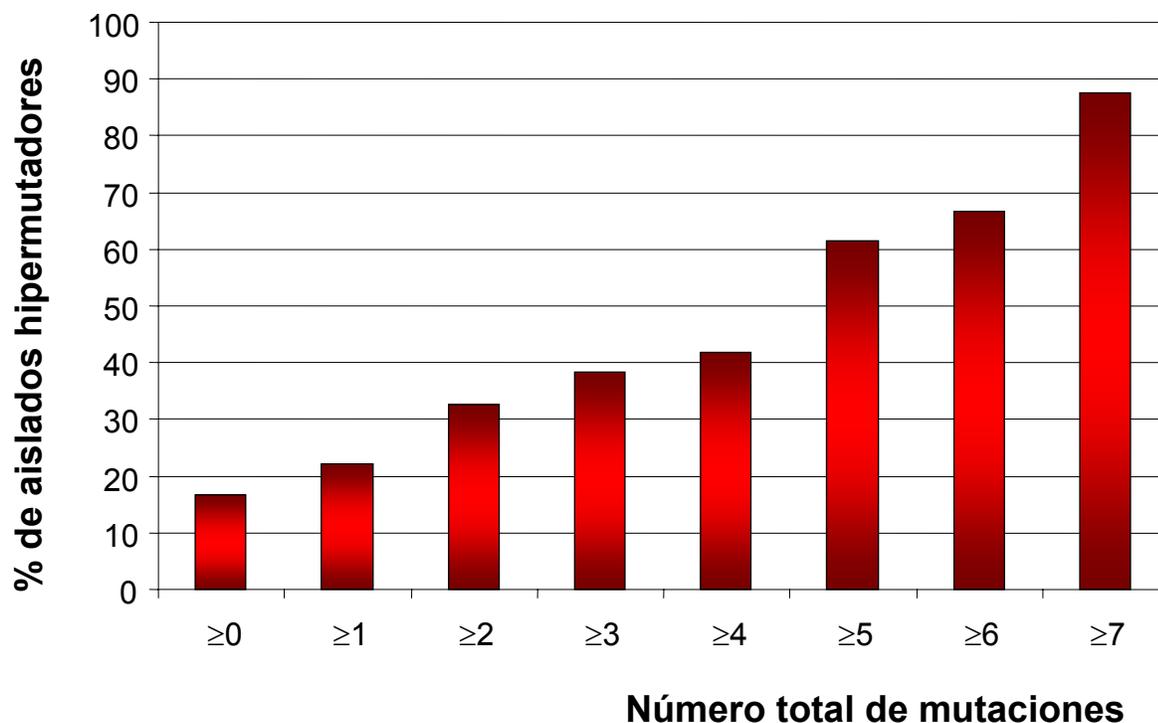
## 2.2 Hipermutación y adaptación genética de *P. aeruginosa* a las vías respiratorias de los pacientes FQ

Con el fin de analizar el efecto de la hipermutación en el proceso de adaptación genética a las vías respiratorias de los pacientes FQ, registramos las mutaciones acumuladas en los aislados hipermutadores y no hipermutadores. Inicialmente analizamos los datos del paciente 1. En el trabajo previo realizado por Smith y col. (2006) se detectaron un total de 68 mutaciones en el último aislado (aislado 35, mes 96) no presentes en el primer aislado (aislado 1, mes 6) mediante la secuenciación del genoma completo (6,5MB), de las cuales sólo 8 resultaron ser mutaciones sinónimas. Interesantemente, la gran mayoría (42 de 68) de las mutaciones detectadas estaban presentes únicamente en los aislados hipermutadores (aislados 32-35), seleccionados durante los últimos 36 meses del periodo total de 90 meses evaluado (Figura 22). Por otro lado, el último aislado no hipermutador (aislado 31, 60 meses) había acumulado sólo 26 de las 68 mutaciones finales en un periodo más largo (54 meses, de los 6 a los 60 meses) (Figura 22). De acuerdo con esto, la tasa establecida de acumulación de mutaciones por año de infección resultó notablemente más alta en el periodo en el que se seleccionaron los aislados hipermutadores (14,0) que en el periodo anterior, en el que únicamente estaban presentes los aislados no hipermutadores (5,7 mutaciones por año). (Figura 22).

A continuación, se analizó la colección de 90 aislados clínicos, obtenidos longitudinalmente de muestras respiratorias de otros 29 pacientes FQ (pacientes 2-30) en los que un total de 34 genes y sus regiones reguladoras habían sido totalmente secuenciados (Smith y col., 2006) (Tabla 4, materiales y métodos). Registramos el número total de mutaciones para los 34 genes, así como el número de nuevas mutaciones acumuladas por año de infección en los aislados secuenciales, para cada cepa tanto hipermutadora como no hipermutadora. Como se muestra en la Figura 23, se observaron diferencias dramáticas en las medianas



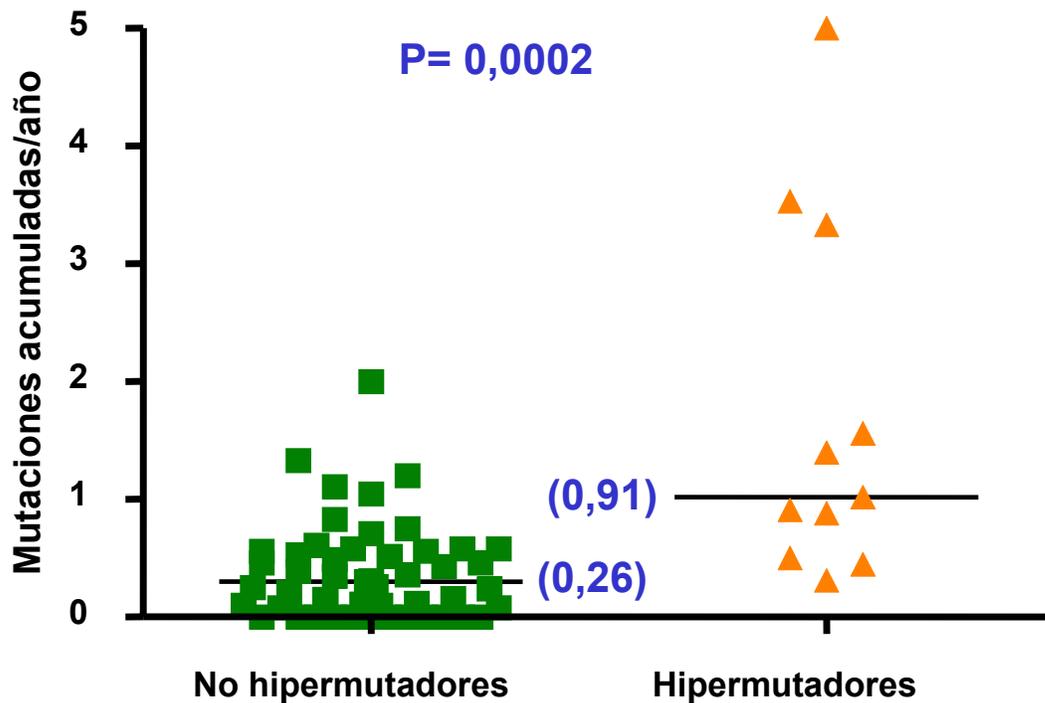
De manera similar, la proporción de aislados hipermutadores se amplificó dramáticamente entre los aislados FQ que contenían un número creciente de mutaciones totales (Figura 24). Por ejemplo, la proporción de aislados hipermutadores aumentó de un 16,7%, cuando se tenían en cuenta todos los aislados, a un 87,5% en aislados que contenían al menos 7 mutaciones (Figura 24).



**Figura 24.** Porcentajes de aislados hipermutadores respecto a las cepas FQ de *P. aeruginosa* según el número de mutaciones en los 34 genes secuenciados.

Obviamente, el número total de mutaciones para un aislado en particular se espera que esté influenciado por el periodo de tiempo transcurrido de la infección crónica (los aislados finales suelen tener mayor número de mutaciones que los primeros) y por tanto, deberían ser mayores en los aislados hipermutadores solo por el hecho de estar sobrerrepresentados en los aislados finales. De hecho, la edad media de los pacientes en el momento del aislamiento de los aislados hipermutadores ( $15,5 \pm 5,8$  años) fue significativamente superior ( $p=0,009$ ) que la edad media de los pacientes cuando se aislaron los aislados no hipermutadores

(11,3  $\pm$ 5,5 años). Para normalizar el rango de tiempo de la infección crónica analizamos el número de mutaciones nuevas acumuladas por año de infección en los aislados secuenciales. Como se muestra en la Figura 25, se observaron diferencias notables otra vez en las medianas de las mutaciones en los 34 genes; los aislados no hipermutadores presentaron una media de tan solo 0,26 mutaciones por año de infección, mientras que la de los mutantes fue de 0,91 ( $p=0,0002$ ).



**Figura 25.** Número de nuevas mutaciones (en los 34 genes secuenciados) que se acumularon por año de infección en los aislados secuenciales hipermutadores y no hipermutadores de los pacientes FQ 2 al 30.

Es más, estos datos posiblemente subestiman la tasa real de acumulación de nuevas mutaciones en los aislados hipermutadores, ya que en una proporción elevada de los casos, éstos estaban precedidos de un aislado no hipermutador. Por lo tanto, en el periodo de tiempo entre ambos aislados, tiene que haber un periodo donde el aislado fuese no hipermutador y un periodo donde el aislado

fuese hipermutador. De acuerdo con esta observación, el número de nuevas mutaciones acumuladas por año de infección en aislados hipermutadores cuyo aislado previo era también un hipermutador (3,33) fue significativamente ( $p=0,04$ ) mayor que la de aquellos aislados hipermutadores en los que el aislado previo era no hipermutador (0,81) (Tabla 13). Siguiendo el mismo razonamiento, los aislados no hipermutadores cuyo aislado previo era hipermutador deberían presentar una mayor tasa de acumulación de nuevas mutaciones, y efectivamente, la mediana para estos aislados fue de 0,90 nuevas mutaciones por año, prácticamente idéntica a la de los aislados hipermutadores, en contraste con los aislados no hipermutadores precedidos de aislados no hipermutadores (0,25) (Tabla 13).

**Tabla 13.** Tasa de acumulación de mutaciones por año de infección en aislados secuenciales hipermutadores y no hipermutadores.

	Número de nuevas mutaciones acumuladas por año de infección		
	Total	Aislado previo hipermutador	Aislado previo no hipermutador
<b>Hipermutadores</b>	0,91	3,33	0,81
<b>No hipermutadores</b>	0,26	0,90	0,25

En esencia, estos resultados muestran que las cepas hipermutadoras aceleran notablemente el proceso de adaptación genética a las vías respiratorias de los pacientes FQ. Posteriormente estudiamos si, además de las diferencias cuantitativas en la acumulación de nuevas mutaciones, existían también diferencias cualitativas entre los aislados hipermutadores y no hipermutadores en los tipos de nuevas mutaciones acumuladas y en los genes afectados.

La Tabla 14 muestra la distribución de los tipos de nuevas mutaciones detectadas en los aislados hipermutadores y no hipermutadores. En general, las diferencias observadas no alcanzaron significancia estadística, aunque los aislados no hipermutadores tendían a tener proporcionalmente más sustituciones de bases

(particularmente mutaciones sin sentido y SNPs en regiones intergénicas) y los aislados hipermutadores más inserciones/delecciones, específicamente debido a la contribución de mutaciones de cambio del marco de lectura producidas por pequeñas inserciones o delecciones (1-4 pb), como cabría esperar para las cepas deficientes en el sistema MMR (Horst y col., 1999).

**Tabla 14.** Distribución de los tipos de nuevas mutaciones en los aislados hipermutadores y no hipermutadores.

Tipo de mutación	Número de nuevas mutaciones (%)	
	Hipermutadores (n=15)	No hipermutadores (n=75)
<b>Total de nuevas mutaciones</b>	66 (100%)	102 (100%)
<b>Sustituciones de bases</b>	42 (63,6%)	69 (67,6%)
Sinónimas	1 (1,5%)	1 (1,0%)
Cambio de sentido	37 (56,1%)	52 (51,0%)
Sin sentido	3 (4,5%)	11 (10,8%)
SNPs (intergénicas)	1 (1,5%)	5 (4,9%)
<b>Inserciones/delecciones</b>	24 (36,4%)	33 (32,3%)
Inserciones/delecciones 1-4 pb	14 (21,2%)	16 (15,7%)
Inserciones/delecciones >4 pb	10 (15,2%)	17 (16,7%)

La Tabla 15, muestra la distribución de nuevas mutaciones entre los genes secuenciados en los aislados hipermutadores y no hipermutadores. Dado que existe una clara relación entre hipermutación y el desarrollo de resistencia antibiótica que ha sido bien establecida en estudios previos (Oliver y col., 2000, Ciofu y col., 2005, Macia y col., 2005, Henrichfreise y col., 2007), nosotros examinamos si el elevado número de genes mutados en los aislados

hipermutadores era una consecuencia de una sobrerrepresentación de mutaciones en genes implicados en la resistencia antimicrobiana. Como se muestra en la Tabla 15, la proporción de mutaciones que afectan a los genes implicados en la resistencia antimicrobiana en el caso de los aislados hipermutadores (35,4%) no era mayor que para los aislados no hipermutadores (38,6%). Es más, no se obtuvieron diferencias significativas para ninguno de los genes estudiados, demostrando así que la hipermutación tiene un efecto generalizado en la adaptación genética no relacionado con un aspecto adaptativo específico. Por ejemplo, de los dos genes que muestran un mayor número de mutaciones en los aislados FQ, uno (*mexZ*) está implicado en la resistencia antibiótica, y el otro (*lasR*) en la regulación del quorum sensing y virulencia (Smith y col., 2006). En la Tabla 15 se puede observar que las mutaciones en estos dos genes aumentaron de igual manera entre los aislados hipermutadores: 0,60 nuevas mutaciones por aislado hipermutador vs 0,27 mutaciones por aislado no hipermutador ( $p=0,015$ ) para *mexZ* y 0,53 nuevas mutaciones por aislado hipermutador vs 0,19 mutaciones por aislado no hipermutador ( $p=0,008$ ) para *lasR*.

**Tabla 15.** Distribución de las nuevas mutaciones en los genes secuenciados en los aislados hipermutadores y no hipermutadores.

Gen <sup>a,b</sup>	Aislados hipermutadores (n=15)		Aislados no hipermutadores (n=75)	
	No de mutaciones (%)	Mutaciones por aislado	No de mutaciones (%)	Mutaciones por aislado
Total nuevas mutaciones	65 (100%)	4,3	101 (100%)	1,3
Total nuevas mutaciones en genes de resistencia antibiótica	23 (35,4%)	1,5	39 (38,6%)	0,52
<i>mexZ</i> (PA2020)	9 (13,8%)	0,60	20 (19,8%)	0,27
<i>lasR</i> (PA1430)	8 (12,3%)	0,53	14 (13,9%)	0,19
PA0313	8 (12,3%)	0,53	12 (11,9%)	0,16
<i>mexA</i> (PA0425)	4 (6,2%)	0,27	7 (6,9%)	0,09
<i>accC</i> (PA4848)	3 (4,6%)	0,20	6 (5,9%)	0,08
<i>vfr</i> (PA0652)	2 (3,1%)	0,13	5 (5,0%)	0,07
<i>mexS</i> (PA2491)	1 (1,5%)	0,07	7 (6,9%)	0,09
<i>exsA</i> (PA1713)	3 (4,6%)	0,20	6 (5,9%)	0,08
PA0506	2 (3,1%)	0,13	5 (5,0%)	0,07
<i>wspF</i> (PA3703)	0 (<1,5%)	<0,07	4 (4,0%)	0,05
<i>rpoN</i> (PA4462)	4 (6,2%)	0,27	3 (3,0%)	0,04
<i>fleQ</i> (PA1097)	3 (4,6%)	0,20	2 (2,0%)	0,03
<i>mexT</i> (PA2492)	4 (6,2%)	0,27	2 (2,0%)	0,03

<sup>a</sup> Únicamente se muestran los genes que presentaban mutaciones en, al menos, 5 aislados hipermutadores.

<sup>b</sup> Las dos mutaciones sinónimas detectadas [una de cada grupo (hipermutadores y no hipermutadores)] fueron excluidas del análisis.



## V. Discusión



En los últimos años se han producido numerosos avances en el conocimiento de los cambios que experimentan las bacterias durante su adaptación a los seres humanos para causar infección, así como de los factores que pueden influir en esta adaptación. La IRC por *P. aeruginosa* en pacientes FQ es uno de los ejemplos más ilustrativos de la evolución natural bacteriana extrema durante el curso de las infecciones en el ser humano. Como ya se ha comentado a lo largo de este trabajo, el sistema MMR es el que más frecuentemente se encuentra relacionado con la aparición de cepas hipermutadoras de *P. aeruginosa* en la infección pulmonar crónica, detectándose en un alto porcentaje en este tipo de pacientes, al contrario de lo que ocurre en los procesos agudos, donde la prevalencia del fenotipo hipermutador es muy baja (Ciofu y col., 2005; Gutiérrez y col., 2004; Maciá y col., 2005; Montanari y col., 2007; Oliver y col., 2000; Oliver y col., 2002[a]). Aunque la relación entre hipermutación y el desarrollo de resistencia antimicrobiana ha sido claramente demostrada, todavía no existe una evidencia clara de la relación entre hipermutación y virulencia e hipermutación y adaptación genética o persistencia. Este trabajo supone una aportación más para el entendimiento del papel que juega la hipermutación, y más concretamente los mutantes deficientes en el sistema MMR, sobre la patogénesis y la adaptación bacteriana así como del complejo proceso evolutivo que se produce en las poblaciones bacterianas cuando causan infección crónica.

### **1. Efecto de la inactivación del sistema MMR sobre el *fitness* y la virulencia.**

El ejemplo más evidente del coste biológico que puede suponer la hipermutación se observa en los mutantes *mutD*. Estos mutantes dan lugar a un fenotipo hipermutador extremadamente fuerte, con una tasa de mutación hasta de 10000 veces, en los que la tasa de crecimiento celular, sin embargo, se encuentra reducida (Echols y col., 1983). En este tipo de mutantes el sistema MMR es funcional, aunque se encuentra saturado probablemente debido a la gran cantidad de errores acumulados (Damagnez y col., 1989). Hasta el momento, los mutantes

*mutD* no se han encontrado en poblaciones naturales, probablemente debido a que serían inviables en la naturaleza. Los mutantes que, sin embargo, sí se encuentran con relativa frecuencia en la naturaleza son los mutantes en el sistema MMR, en los que la tasa de mutación se encuentra aumentada entre 100 y 1000 veces. Las consecuencias de la hipermutación en relación con la virulencia y el *fitness* en este tipo de mutantes se han estudiado en diferentes microorganismos a lo largo de los últimos años, principalmente en *E. coli*. En 2001, Picard y col. evaluaron la virulencia en cepas de *E. coli* hipermutadoras, deficientes en el MMR, y no hipermutadoras en un modelo murino de infección peritoneal documentando que la mayoría de los aislados hipermutadores presentaban un nivel de virulencia intermedio y que, por lo tanto, la inactivación de *mutS* no parecía tener un efecto directo sobre la virulencia. También se han realizado estudios de inactivación del sistema MMR en otras especies como *Lysteria* o *Salmonella*. Así, Merino y col. (2002) demostraron que la delección del locus *mutSL* en *Lysteria monocytogenes* reduce la virulencia (aumentando 1 log la DL<sub>50</sub>) de este patógeno intracelular en un modelo murino de infección, mientras que, al igual que ocurría en *E. coli*, la inactivación de *mutS* parece no tener un efecto directo sobre la virulencia en modelos animales de infección por *Salmonella typhimurium* (Campoy y col., 2000; Zahrt y col., 1999).

En el caso de *P. aeruginosa* nuestros experimentos demuestran que sí existe un coste biológico claramente determinado por la inactivación del gen *mutS*. La cepa PAO $\Delta$ *mutS* fue desplazada por la cepa *wild-type* PAO1 en todos los experimentos de competición, tanto *in vivo* como *in vitro*. La reducción en el *fitness* fue modesta, aunque significativa ( $p < 0,001$ ) en los modelos de competición *in vitro*, sin embargo la inactivación del sistema MMR determinó un coste biológico importante para la cepa PAO $\Delta$ *mutS* en los dos modelos de infección aguda *in vivo*, respiratoria y sistémica. También hemos podido documentar, mediante los dos modelos de infección aguda, una clara reducción de la virulencia para la cepa deficiente en *mutS*. La mortalidad de los ratones que fueron infectados con la PAO $\Delta$ *mutS* fue significativamente menor que en los ratones infectados con la PAO1 tanto en la infección sistémica como en la respiratoria, aunque de manera menos acentuada

en ésta última.

Otros trabajos que han analizado estos aspectos en *P. aeruginosa* y cuyos datos coinciden con los nuestros, son los de Hogardt y col. (2007) y Montanari y col. (2007). En el primero, se analizaron cepas de *P. aeruginosa* con diferentes mutaciones en *mutS*, obtenidas de estadios finales de la infección pulmonar crónica en tres pacientes FQ demostrando que éstas sufrían una pérdida de factores de virulencia así como de su citotoxicidad. Por otra parte, Montanari y col. (2007) realizaron modelos de competición *in vivo* e *in vitro* con cepas clínicas *wild-type* y su correspondiente clon hipermutador (deficiente en el sistema MMR), documentándose nuevamente que la hipermutación está asociada con un notable coste biológico.

Nuestros resultados suponen un paso más en la documentación del efecto de la inactivación del sistema MMR sobre la virulencia y el *fitness*. En el caso de *P. aeruginosa*, al igual que ocurre en *Lysteria monocytogenes*, la inactivación de este sistema provoca una reducción de la virulencia, al contrario de lo que se observa en *E. coli* y en *Salmonella* donde no parece existir una relación directa. Esta reducción tanto de la virulencia como del *fitness* en las cepas de *P. aeruginosa* en las que el gen *mutS* se encuentra inactivado podría, por lo tanto, disminuir su capacidad para producir infecciones agudas y además reducir la posibilidad de su selección durante el curso de un proceso de infección aguda incluso bajo la gran presión selectiva ejercida por el tratamiento antimicrobiano.

## **2. Efecto de la hipermutación sobre la adaptación y evolución bacteriana en modelos experimentales.**

A lo largo de la última década, varios modelos teóricos, *in vitro* e *in vivo* han demostrado que bajo circunstancias particulares como la exposición a nuevos ambientes o condiciones de estrés, se seleccionan cepas hipermutadoras en las poblaciones bacterianas. Este fenotipo hipermutador puede conferir una ventaja evolutiva durante la exposición de la bacteria a estos ambientes nuevos,

cambiantes o de estrés, incrementando la tasa de mutaciones adaptativas (Denamur y col., 2006; Giraud y col., 2001; Mao y col., 1997; Sniegowski y col., 1997; Taddei y col., 1997). Varios modelos experimentales han demostrado que la adaptación al sistema inmune del huésped (Nilsson y col., 2004), a los tratamientos antibióticos (Maciá y col., 2006), o a la parasitación por virus (Pal y col., 2007), está acelerada en los fenotipos hipermutadores.

La asociación de la hipermutación con uno de los más relevantes tipos de mutaciones adaptativas que favorece la persistencia en las infecciones crónicas, el desarrollo de resistencia antibiótica, ha sido claramente documentado (Ciofu y col., 2005; Maciá y col., 2005; Oliver y col., 2000). Una alta prevalencia de cepas hipermutadoras, asociado con la resistencia antibiótica, ha sido también documentada para otros patógenos relevantes que infectan crónicamente a pacientes FQ como son *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* (Prunier y col., 2003; Román y col., 2004; Watson y col., 2004). Sin embargo, hasta el momento, no se ha demostrado una clara relación entre la hipermutación y la persistencia o adaptación genética en las infecciones crónicas.

Varios modelos *in vivo*, aunque ninguno realizado con *Pseudomonas*, han demostrado que la hipermutación debe favorecer la adaptación y persistencia de los patógenos bacterianos. Estos trabajos, realizados con cepas deficientes en el sistema MMR, demostraron que la hipermutación, inicialmente, debe ser beneficiosa porque permite la adaptación más rápida de *E. coli* en un modelo de colonización intestinal (Giraud y col., 2001) y su persistencia en infecciones del tracto urinario (Labat y col., 2005), así como la adaptación de *Salmonella* al sistema reticuloendotelial (Nilsson y col., 2004). Los resultados de nuestro modelo de colonización orofaríngea en ratones FQ aporta datos relevantes en esta misma dirección. Aunque la cepa deficiente en *mutS* mostró un potencial reducido para la colonización orofaríngea inicial en los ratones FQ comparado con la *wild-type*, fue invariablemente seleccionada tras un largo periodo de colonización en ausencia de presión antibiótica, sugiriendo claramente que la hipermutación favorece la selección de mutaciones adaptativas requeridas para la persistencia a largo plazo. Sin embargo, y de acuerdo con los experimentos de competición comentados

anteriormente, las cepas persistentes deficientes en *mutS* no mostraron una capacidad incrementada para la colonización orofaríngea posterior de nuevos ratones FQ, más bien al contrario, ya que todas las estirpes adaptadas fueron desplazadas por la cepa *wild-type* durante la colonización orofaríngea inicial de nuevos ratones FQ. Estos resultados, en concordancia con aquellos recogidos en estudios con cepas clínicas de pacientes FQ (Ciofu y col., 2005; Oliver y col., 2000), sugieren que las cepas hipermutadoras se seleccionan como consecuencia de la adaptación al ambiente del tracto respiratorio de los pacientes FQ pero además que su capacidad para la colonización eficiente de ambientes secundarios (incluyendo otros pacientes FQ) estaría reducida. Esto mismo se observa también en los trabajos de Hogardt y col. (2007) y Montanari y col. (2007) donde se pone de manifiesto el coste biológico que la adaptación de estas cepas supone para las células reduciendo así su viabilidad, y la capacidad de sobrevivir libremente, y como consecuencia, su transmisibilidad. En concordancia con estos datos, en un estudio reciente se observó que dos clones de *P. aeruginosa* no hipermutadores predominantes a lo largo de 20 años en una población de pacientes FQ, eran perfectamente transmisibles entre pacientes, demostrando, además con ello, que rasgos tan comúnmente relacionados con el establecimiento de la infección crónica por *P. aeruginosa* como el fenotipo mucóide o la producción de factores de virulencia, tal vez, no estén tan relacionados con la transmisibilidad de los clones (Jelsbak y col., 2007).

Aunque la colonización orofaríngea persistente por *PAOΔmutS* se documentó en un 20% de los ratones FQ, no fuimos capaces de documentar signos claros de un aumento progresivo de la colonización del tracto respiratorio inferior y de la posterior respuesta inflamatoria patológica durante los seis meses estudiados. Las variantes mucosas, marcadores típicos de colonización respiratoria crónica por *P. aeruginosa* en pacientes FQ (Govan y Deretic 1996) tampoco fueron detectadas, aunque otra variante fenotípica frecuente en la FQ, las *small colony variants* (SCV) (Häußler y col., 1999) fueron seleccionadas frecuentemente a partir de la cepa *PAOΔmutS* (datos no mostrados).

En general estos resultados sugieren que durante el marco de tiempo, de seis

meses, estudiado (que no puede ser mucho más alto con este modelo debido a la esperanza de vida natural de los ratones) sólo se alcanzaron las primeras etapas del complejo proceso de colonización crónica respiratoria. Por otra parte, estas observaciones hacen este modelo bastante compatible con la historia natural del proceso en pacientes FQ, en los que los marcadores de colonización crónica aparecen típicamente varios meses después de la colonización inicial (Gibson y col., 2003). El proceso respiratorio crónico por si mismo (pero no su historia natural) puede ciertamente ser más eficientemente reproducido y estudiado por la inoculación directa en el tracto respiratorio de ratones FQ (o incluso no-FQ) de cepas naturales (y por lo tanto adaptadas) de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes FQ crónicamente infectados, particularmente aquellas cepas que muestran el fenotipo mucóide característico (Hoffmann y col., 2005). Nosotros intencionadamente usamos la cepa de *P. aeruginosa* no adaptada PAO1 (y su derivada deficiente en *mutS*), que es la primera cepa de referencia completamente secuenciada y ampliamente utilizada (Stover y col., 2000) (aislada de una infección de herida hace unos 50 años), y la exposición en el agua de bebida (en lugar de la inoculación directa) con el objetivo de reproducir el proceso de adaptación natural en la colonización crónica respiratoria en la FQ.

### 3. Hipermutación en poblaciones bacterianas naturales

La frecuencia de cepas hipermutadoras que se han encontrado en la naturaleza ha resultado ser mucho mayor de lo esperado. En los trabajos iniciales la hipermutación se asoció a la patogenicidad al observar que la incidencia de cepas hipermutadoras era mayor (alrededor al 1%) en aislados patógenos de *E. coli* y *Salmonella enterica* que en aislados no patógenos (Le Clerc y col., 1996). Sin embargo, poco después se encontró una frecuencia de cepas hipermutadoras similar en aislados comensales y patógenos de *E. coli* (Matic y col., 1997). A lo largo de los años, las cepas hipermutadoras han sido descritas en diversas poblaciones bacterianas naturales con presencia variable (Baquero y col., 2004;

Le Clerc y col., 1996; Matic y col., 1997), sin embargo, parecen estar sobrerrepresentadas en las infecciones crónicas, mientras que son poco frecuentes en las infecciones con procesos agudos. Oliver y col. (2000) proporcionaron la primera evidencia de la selección del fenotipo hipermutador en poblaciones naturales de *P. aeruginosa* mediante el estudio de la infección pulmonar crónica por este microorganismo en pacientes FQ. La prevalencia de cepas hipermutadoras encontradas en estos pacientes resultó ser, con diferencia, la mayor descrita jamás en la naturaleza hasta ese momento. Se encontró que el 37% de los pacientes FQ estaban colonizados por cepas hipermutadoras, mientras que el fenotipo hipermutador no aparecía en pacientes no FQ que presentaban infección aguda por *P. aeruginosa*. Estudios posteriores realizados por Ciofu y col., (2005) y Montanari y col., (2007) han confirmado el alto porcentaje de pacientes FQ que se colonizan o infectan con cepas hipermutadoras de *P. aeruginosa* (54,4% y 60%, respectivamente). Sin embargo, no se trata de un hecho exclusivo de la FQ, ya que se ha demostrado que ocurre lo mismo en otras enfermedades respiratorias crónicas como son las bronquiectasias o el EPOC (Maciá y col., 2005). Es, por tanto, un rasgo diferencial de las infecciones pulmonares crónicas por *P. aeruginosa*, la alta prevalencia (30-60%) de cepas hipermutadoras, en contraste con lo que se observa en procesos agudos (< 1%). Por ejemplo, Gutiérrez y col. (2004) encontraron un solo aislado hipermutador de un total de 103 pacientes de la UCI con infecciones por *P. aeruginosa*. Además, se ha observado que la relación entre hipermutación e infección crónica no es exclusiva de *P. aeruginosa*, existen trabajos donde se ha encontrado un mayor prevalencia (14%) de cepas hipermutadoras de *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* en pacientes FQ que en pacientes con otro tipo de infecciones (1%) (Prunier y col, 2003; Román y col., 2004).

Nuestros resultados, donde se analiza por primera vez una colección de aislados de pacientes FQ norteamericana (Smith y col., 2006), encajan bien con los resultados previos. Encontramos que el 31% de los 29 pacientes estudiados estaban colonizados por cepas hipermutadoras. Estos trabajos demuestran que el fenotipo hipermutador se selecciona, principalmente, en procesos crónicos y que,

por lo tanto, debe jugar un importante papel en la adaptación bacteriana para la persistencia a largo plazo. Se ha demostrado, sin embargo, que la prevalencia de cepas hipermutadoras en fases tempranas de la infección por *P. aeruginosa* en pacientes FQ así como en el ambiente, es mayor de lo que cabía esperar (Kenna y col., 2007) sugiriendo que el pulmón FQ no debe ser el único factor que influye en la aparición de las cepas hipermutadoras en estos pacientes. Nuestros datos muestran que la mayoría de las líneas hipermutadoras emergieron durante el desarrollo de la IRC a partir de cepas clonales (24,1%), aunque en 2 de los pacientes (6,9%) los mutantes se detectaron en los primeros aislados, obtenidos al inicio de la infección pulmonar. Estos datos sugieren que, en algunos casos, los pacientes FQ se colonizan con cepas que eran previamente hipermutadoras y que pueden encontrarse en el ambiente. Debe destacarse, por lo tanto, el importante papel que juega el pulmón FQ en la selección de estas cepas hipermutadoras, sin embargo, no debe subestimarse la existencia de aislados hipermutadores en el ambiente.

#### **4. Bases genéticas de la hipermutación en poblaciones naturales**

Alrededor de un 65 % de las cepas hipermutadoras de *P. aeruginosa* que ocurren de forma natural presentan deficiencias en alguno de los genes del sistema MMR (*mutS*, *mutL*, o *uvrD*), siendo *mutS* el gen que más frecuentemente se encuentra afectado (Hogardt y col., 2006; Montanari y col., 2007; Oliver y col., 2002[a]). Por supuesto existen otros genes mutadores, como *mutT*, *mutM*, *mutY*, o el recientemente descrito *pfpl* (Oliver y col., 2002[b]; Rodríguez-Rojas y Blázquez 2009), la mayoría identificados mediante estudios *in vitro* puesto que no se ha estudiado, hasta el momento, su prevalencia en la naturaleza. Hogardt y col., (2006) observaron diferentes tipos de mutaciones inactivantes en *mutS* en cepas de *P. aeruginosa* de pacientes FQ. Principalmente observaron cambios en el marco de lectura debido a deleciones o inserciones de nucleótidos, y en menor medida, a sustituciones de aminoácidos. La gran mayoría de las cepas

hipermutadoras detectadas en nuestro trabajo, incluyendo el último aislado del primer paciente, que ha sido el primer aislado de FQ completamente secuenciado (Smith y col., 2006), también resultaron ser defectivas en los genes *mutS* o *mutL* del sistema MMR. La mayoría de los aislados hipermutadores presentando mutaciones directamente inactivantes en estos genes, por cambios en el marco de lectura o por formación de un codon stop (Tabla 11). Sin embargo, en uno de los aislados la inactivación de MutS fue debida a una sustitución de aminoácido. Resulta interesante el hecho de que este aislado presentaba las dos sustituciones R306C y A187S. La sustitución R306C se describe por primera vez en este trabajo como una mutación inactivante del gen *mutS* e implica cambios en un residuo altamente conservado localizado en el dominio IV de unión al DNA (Lamers y col., 2000). Por otra parte, la sustitución A187S, clasificada por Hogardt y col. (2006) como una mutación inactivante de *mutS*, se ha descrito frecuentemente en aislados hipermutadores en varias colecciones diferentes incluyendo la cepa epidémica de Liverpool (Hogardt y col., 2006; Kenna y col., 2007; Montanari y col., 2007). Sin embargo, en nuestro trabajo este polimorfismo se encontró también en los aislados isogénicos previos no hipermutadores. Más aún, la sustitución A187S se encontró también en otro aislado deficiente en *mutS* con una inserción (4pb) en este gen así como en su aislado isogénico previo no hipermutador. Estos datos sugieren, por tanto, que la sustitución A187S, aunque podría tener algún efecto sobre la actividad de MutS, no causa la inactivación de este gen. Es más, al secuenciar dos aislados no hipermutadores isogénicos de la cepa epidémica de Liverpool observamos que también poseían la sustitución A187S. Por otro lado, pudimos comprobar que la presencia relativamente frecuente de este polimorfismo se debe a que se trata de un mismo clon que se encuentra ampliamente extendido (ST 17), ya que tanto los aislados de los dos pacientes que presentaban el polimorfismo A187S como los descritos por Montanari y por Hogardt resultaron ser el mismo clon.

Otro hecho especialmente interesante que observamos en la colección de Smith y col. (2006) fue la selección independiente, en uno de los pacientes, de mutantes *mutS* y *mutL*. Este paciente presentaba aislados iniciales no hipermutadores

seguidos de dos aislados secuenciales deficientes en *mutS* y un aislado posterior deficiente en *mutL*. Este hecho podría hacernos pensar que el paciente había sido colonizado por otra cepa. Sin embargo, se comprobó que todos los aislados eran isogénicos y que, por tanto, se habían seleccionado dos líneas independientes durante el desarrollo de la IRC. Curiosamente, en el aislado deficiente en *mutL*, se encontraron dos sustituciones en este gen, T118A y A124V, que no estaban presentes en el resto de aislados previos. Cabe pensar que una de las mutaciones, seleccionada en primer lugar, sería la responsable de la inactivación de MutL mientras que la segunda, sería una mutación compensatoria para restaurar un posible efecto deletéreo causado por la primera mutación. En cuanto a la selección de líneas hipermutadoras independientes, observamos un hecho parecido en otro paciente, con la diferencia de que éste presentaba un aislado inicial hipermutador débil sin alteraciones en el sistema MMR, seguido de un aislado isogénico deficiente en *mutS*. La observación de estos hechos ilustra, por lo tanto, una clara evidencia de que se produce una selección positiva de mutaciones inactivantes del sistema MMR durante la IRC.

##### **5. Papel de la hipermutación en la adaptación y evolución en poblaciones bacterianas naturales.**

El proceso de adaptación de *P. aeruginosa* al ambiente hostil y heterogéneo del pulmón del paciente FQ conlleva la selección de mutaciones adaptativas que dan lugar a las diferentes variantes genéticas y fenotípicas que deben favorecer la elevada frecuencia de cepas hipermutadoras que se observa en estos pacientes (Ciofu y col., 2005; Kresse y col., 2003; Oliver y col., 2000). El trabajo de Hogardt y col. (2007), que analizó la diversificación fenotípica y genotípica de cepas hipermutadoras (deficientes en *mutS*) y no hipermutadoras de diferentes clones de *P. aeruginosa* de pacientes FQ, evidenciaba la rápida adaptación de *P. aeruginosa* a las vías respiratorias de estos pacientes mediante la generación de numerosas variantes fenotípicas causadas por la hipermutación. De hecho, se ha demostrado

experimentalmente que, mutaciones que se seleccionan frecuentemente, como la hiperproducción de alginato, la pérdida de flagelo o el lipopolisacárido modificado, contribuyen significativamente a la adaptación bacteriana durante la IRC (Oliver y col., 2007).

Otros trabajos, como los de Smith y col. (2006) y Mathee y col. (2008), han demostrado, recientemente, que *P. aeruginosa* puede sufrir una intensa adaptación genética y “customizar” su genoma con el fin de adquirir los rasgos necesarios para sobrevivir en un ambiente determinado. Se ha observado que las propiedades genéticas de las células bacterianas presentes tardíamente en las infecciones por *P. aeruginosa* en pacientes FQ difieren enormemente de aquellas que inician la infección años antes de que el declive pulmonar comprometa la vida del paciente. En el estudio realizado por Smith y col. se detectaron, mediante la secuenciación total del genoma, un total de 68 mutaciones de diferencia entre dos aislados del mismo paciente recogidos con 7,5 años de diferencia, mostrando una clara señal de selección positiva. La persistencia a largo plazo en las vías aéreas de los pacientes FQ, por lo tanto, parece ir de la mano de la selección de múltiples mutaciones, frecuentemente de pérdida de función, representadas por un patrón de resistencia antimicrobiana incrementada, reducción de la virulencia y adaptación metabólica específica (Smith y col., 2006).

En nuestro trabajo, de acuerdo con hipótesis previas, se demuestra que la hipermutación tiene un efecto muy importante en la intensa evolución de *P. aeruginosa* durante la IRC. Como se muestra en los resultados, la presencia de rasgos adaptativos no es homogénea a lo largo de todos los aislados FQ, sino que por el contrario, está significativamente concentrada en las líneas deficientes en el sistema MMR. Así pues, en el paciente 1, la gran mayoría de mutaciones detectadas (42 de 68) estaban presentes únicamente en los aislados hipermutadores, seleccionados en un período de tiempo más corto. Es más, la presencia de mutaciones en los 34 genes estudiados para los aislados de los 29 pacientes restantes fue bastante infrecuente en los aislados no hipermutadores (mediana de sólo 1 mutación por aislado), mientras que fue más de 6,5 veces mayor en los hipermutadores. Además, la amplificación de las poblaciones

hipermutadoras por acumulación de mutaciones adaptativas previamente demostrado *in vitro* (Mao y col., 1997), se documenta por primera vez, en este trabajo, en el curso de las infecciones naturales en humanos (tal y como se ilustra en la Figura 23). Las diferencias documentadas en las tasas de acumulación de mutaciones por año de infección son realmente abrumadoras: mientras que líneas secuenciales no hipermutadoras adquieren una mediana de tan solo 0,25 mutaciones / año de infección, las líneas secuenciales hipermutadoras acumulan más de 3 mutaciones / año, una tasa 13 veces superior. Estos resultados demuestran, por lo tanto, que los aislados hipermutadores aceleran notablemente el proceso de adaptación genética a las vías respiratorias de los pacientes FQ.

Basándonos en estudios previos parecería razonable pensar que la alta prevalencia de cepas hipermutadoras es principalmente el resultado de su co-selección con mutaciones determinantes del desarrollo de resistencia antibiótica durante los frecuentes y prolongados episodios de tratamiento antibiótico, administrados en un intento de minimizar el efecto deletéreo de la colonización a largo plazo por *P. aeruginosa*. Sin embargo, las mutaciones de resistencia a antibióticos podrían ser sólo una más de las posibles mutaciones adaptativas que favorecen la persistencia en las infecciones crónicas, ya que son fácilmente reconocibles, pero podrían enmascarar otras muchas, particularmente aquellas que determinan la tolerancia a los mecanismos de aclaramiento natural ejercidos por el sistema inmune innato y adaptativo del huésped infectado (Ciofu y col., 2005; Oliver y col., 2000) o quizás también otras como aquellas que favorecen el desplazamiento competitivo de la flora intrínseca orofaríngea. En este sentido, resulta interesante el hecho de que la mayor acumulación de mutaciones en los aislados hipermutadores de nuestra colección no es consecuencia de una sobrerrepresentación de mutaciones en genes implicados en la resistencia antibiótica, el único rasgo adaptativo vinculado hasta el momento con la hipermutación en la FQ (Henrichfreise y col., 2007; Oliver y col., 2000). De hecho, en la mayoría de los genes estudiados el número de mutaciones aumenta en los aislados hipermutadores pero sin predominio de alguno de ellos. Estos resultados, además, coinciden con los obtenidos en el modelo de colonización crónica en

ratones FQ, en los que la hipermutación favorece la persistencia a largo plazo incluso en ausencia de tratamiento antimicrobiano. Esto demuestra que la hipermutación tiene un efecto generalizado en la evolución y adaptación de *P. aeruginosa* durante la IRC.

Estos datos también van a favor de estudios recientes en los que se ha visto que la inactivación del MMR favorece la aparición *in vitro* de múltiples variantes fenotípicas de *P. aeruginosa*, incluidos los mutantes *lasR* y *mucA*, marcadores típicos de infección pulmonar en la FQ (Lujan y col., 2007; Moyano y col., 2007). La inactivación mutacional del regulador transcripcional *lasR* puede ser considerado uno de los paradigmas de tal patrón de evolución, ya que es extraordinariamente frecuente en el contexto de la FQ y reúne las tres características mencionadas anteriormente, probablemente por estar asociada al sistema *quorum sensing*; un patrón de resistencia antimicrobiana incrementada, reducción de la virulencia y adaptación metabólica específica (D'Argenio y col., 2007). De hecho, en el análisis genético de la colección de aislados de *P. aeruginosa* de pacientes FQ realizado por Smith y col. (2006) se observó, precisamente, que el gen que más frecuentemente presentaba mutaciones era el gen *lasR*. Recientemente (Hoffman y col., 2009) se ha observado que la prevalencia de mutantes *lasR* es comparable a la presencia del fenotipo mucóide en los pacientes FQ pero apareciendo en edades más tempranas. Además, al igual que el fenotipo mucóide, la presencia de mutantes *lasR* se puede relacionar con un mayor declive de la función pulmonar y servir, por tanto, como marcador de mal pronóstico.

Nuestros resultados muestran que la inactivación del gen *lasR* es también más frecuente en los aislados hipermutadores (0,53 nuevas mutaciones por aislado) que en los no hipermutadores (0,19 mutaciones por aislado), evidenciando el importante papel que debe jugar este regulador transcripcional en la adaptación bacteriana.

En general, los pacientes FQ se colonizan por una cepa de *P. aeruginosa* que, en muchos casos, puede persistir durante toda la vida del paciente (Römling y col., 1994). En otros casos, en los que dos clones compiten, se produce el

desplazamiento de un clon por el otro (Jelsbak y col., 2007). En cualquier caso estas cepas suelen diverger rápidamente en diversas variantes fenotípicas (radiación adaptativa) (Oliver y col., 2000; Rainey y col., 1998) de manera que la evolución de las diferentes líneas está caracterizada por la acumulación de mutaciones individuales y el conjunto de las mutaciones adquiridas en cada uno de los aislados refleja la historia natural de la adaptación genética. En el caso de nuestra colección de cepas hemos podido observar, en todos los casos, que cada paciente presenta un mismo clon para todos sus aislados secuenciales. Estos datos nos permiten pensar, por lo tanto, que la transición del fenotipo no hipermutador a hipermutador (y viceversa) es una consecuencia de eventos mutacionales que favorecerían la adaptación y la permanencia de estas cepas en el ambiente del pulmón FQ, y que, efectivamente, no se trata de un fenómeno de sustitución de cepas.

Finalmente, cabe destacar que mientras que el efecto de la hipermutación en la evolución bacteriana durante la IRC está claro, sus implicaciones en la progresión de la enfermedad son todavía inciertas. En un estudio muy reciente, la presencia de hipermutadores se relacionó, de hecho, con una peor función pulmonar, no obstante, resulta muy difícil demostrar que la hipermutación sea un factor de riesgo independiente en esta mala evolución (Waine y col., 2008). Por otra parte, es de esperar que el “atajo” hacia la adaptación genética en las vías respiratorias de los pacientes FQ proporcionada por la hipermutación, tenga algún coste. Mientras que la adquisición de mutaciones bajo presión selectiva positiva debe acelerar la adaptación, también puede conducir a la acumulación de mutaciones deletéreas para ambientes secundarios. De hecho, las líneas hipermutadoras adaptadas obtenidas en el modelo de colonización crónica en ratones FQ demuestran una capacidad de colonización, y por tanto, de transmisibilidad reducida.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo amplían el conocimiento del efecto que la hipermutación provoca sobre la virulencia, el *fitness* y la persistencia o adaptación de *P. aeruginosa* en la infección pulmonar crónica en el contexto de la FQ. La inactivación del principal sistema implicado en la hipermutación, el sistema MMR, en *P. aeruginosa* reduce la virulencia en las infecciones agudas, reduce el *fitness*, tanto *in vitro* como *in vivo*, disminuyendo, por tanto, la transmisibilidad y disminuye el potencial de colonización orofaríngea inicial, pero por otra parte favorece la persistencia a largo plazo de la colonización orofaríngea en la FQ. Estos resultados nos ayudan a entender el porqué de la alta y baja prevalencia de cepas hipermutadoras de *P. aeruginosa* en las infecciones crónicas y agudas, respectivamente. Por otra parte, nuestros resultados demuestran que la hipermutación actúa como un catalizador en la acumulación de mutaciones adaptativas, favoreciendo, así, la adaptación genética al pulmón FQ.



## VI. Conclusiones



1. La inactivación del sistema MMR en *P. aeruginosa* está asociada con un coste biológico, provocando una modesta pero significativa disminución del *fitness in vitro*.
2. La inactivación del sistema MMR en *P. aeruginosa* determina una reducción importante del *fitness* y la virulencia en modelos murinos de infección sistémica y respiratoria poniendo de manifiesto la capacidad reducida de las cepas hipermutadoras para provocar infecciones agudas.
3. En concordancia con estudios previos, nuestros resultados demuestran que los ratones transgénicos con FQ presentan una mayor susceptibilidad a la colonización orofaríngea por *P. aeruginosa* que los ratones *wild-type*.
4. Los antibióticos de amplio espectro, como amoxicilina-clavulánico, que se administran frecuentemente en niños con FQ para evitar la colonización/infección por *S. aureus* y *H. influenzae*, favorecen la colonización orofaríngea inicial por *P. aeruginosa* en ratones con FQ.
5. La inactivación del sistema MMR en *P. aeruginosa* reduce la capacidad de colonización orofaríngea inicial en el modelo animal de FQ.
6. La inactivación del sistema MMR en *P. aeruginosa* favorece la colonización orofaríngea a largo plazo en el modelo animal de FQ, probablemente debido a que la elevada tasa de mutación favorece la selección de las mutaciones adaptativas requeridas para la persistencia.
7. La adaptación a las vías respiratorias de *P. aeruginosa* en el modelo animal de FQ, favorecida por la inactivación del sistema MMR, conlleva un coste biológico que se refleja en su menor capacidad para colonizar nuevos ratones y, por lo tanto, en su menor transmisibilidad, probablemente debido

a la acumulación de mutaciones deletéreas para la colonización de ambientes secundarios.

8. En concordancia con trabajos anteriores, se evidencia una elevada prevalencia de aislados hipermutadores de *P. aeruginosa* que emergen durante el desarrollo de la IRC en la FQ. En el 24% de los pacientes se desarrolló el fenotipo hipermutador durante el proceso de la infección crónica, mientras que en el 7% de los pacientes los aislados iniciales eran ya hipermutadores.
9. Mediante estudios de complementación y secuenciación se demostró una elevada prevalencia de aislados hipermutadores deficientes en el sistema MMR ilustrando una clara evidencia de selección positiva de mutaciones inactivantes de este sistema durante la IRC: cerca del 90% de las cepas hipermutadoras resultaron ser defectivas en *mutS* o *mutL*.
10. Los resultados obtenidos mediante técnicas de tipificación molecular muestran que la transición del fenotipo no hipermutador a hipermutador (y viceversa), es principalmente consecuencia de eventos mutacionales y no de reemplazamiento de cepas durante el proceso de infección.
11. La sustitución R306C, que se describe por primera vez y que implica cambios en un residuo altamente conservado localizado en el dominio IV de unión a ADN, es responsable de la inactivación de MutS. Por el contrario, la sustitución A187S, previamente descrita como tal, no sería realmente una mutación inactivante.
12. Los aislados hipermutadores presentaron una tasa de acumulación de mutaciones adaptativas por año de infección 13 veces superior a la de los aislados no hipermutadores, demostrando que la hipermutación cataliza el proceso de adaptación genética de *P. aeruginosa* en la IRC en los

pacientes FQ.

13. La hipermutación tiene un efecto generalizado en la evolución y adaptación genética de *P. aeruginosa* en la IRC, ya que el número de mutaciones observadas en los genes estudiados, inclusive los asociados al desarrollo de resistencia antibiótica, aumentó de manera similar para todos ellos en los aislados hipermutadores respecto a los no hipermutadores.
14. En conjunto, estos resultados nos ayudan a comprender los factores responsables de que la prevalencia de cepas hipermutadoras sea muy elevada en las infecciones crónicas y muy baja en las agudas.



## VII. Referencias bibliográficas



**Alonso A, Rojo F, Martinez JL.** 1999. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* **1**:421-430.

**Anderson SW, Stapp JR, Burns JL, Qin X.** 2007. Characterization of small-colony-variant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the sputum specimens of five patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **45**(2):529-535.

**Bagge N, Morten M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Hoiby N.** 2004. Dynamics and spatial distribution of  $\beta$ -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother* **48**: 1168-1174.

**Baquero MR, Nilsson AI, Turrientes MC, Sandvang D, Galan JC, Martínez JL, Frimodt-Moller N, Baquero F, Andersson DI.** 2004. Polymorphic mutation frequencies in *Escherichia coli*: emergence of weak mutators in clinical isolates. *J Bacteriol* **186**: 5538-5542.

**Barbieri JT, Sun J.** 2004. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **152**: 79-92.

**Bauernfeind A, Emminger G, Horl G, Lorbeer H, Przylenk B, Weisslein-Pfister C.** 1987. Selective pressure of antistaphylococcal chemotherapeutics in favor of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Infection* **15**: 469-470.

**Bauernfeind A, Horl G, Przyklenk B.** 1988. Microbiologic and therapeutic aspects of *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients. *Scand J Gastroenterol* **143**(Suppl.): 99-102.

**Baum J, Barza M.** 1990. *Pseudomonas* keratitis and extended-wear soft contact lenses. *Arch Ophthalmol* **108**: 663-664.

**Bear CE, Li CH, Kartner N, Bridges RJ, Jensen TJ, Ramjeesingh M, Riordan JR.** 1992. Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). *Cell* **68**: 809-818.

**Beulac C, Clément-Major S, Hawari J, Lagacé J.** 1996. Eradication of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with fluid liposome-encapsulated tobramycin in an animal model of chronic pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(3): 665-669.

**Bernardini J, Piraino B, Sorkin M.** 1987. Analysis of continuous ambulatory peritoneal dialysis-related *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Am J Med* **83**: 829-832.

**Bjorkholm B, Sjolund M, Falk PG, Berg OG, Engstrand L, Andersson DI.** 2001. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14607-14612.

**Blázquez J, Oliver A, Gómez-Gómez JM.** Mutation and evolution of antibiotic resistance: antibiotics as promoters of antibiotic resistance? *Curr Drug Targets* **3**: 345-349.

**Blázquez J.** 2003. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis* **37**: 1201-1209.

**Blázquez J, Gómez-Gómez JM, Oliver A, Juan C, Kapur V, Martín S.** 2006. PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **62**: 84-99.

**Boat TF, Cheng PW.** 1989. Epithelial cell dysfunction in cystic fibrosis: implications for airways disease. *Acta Paediatr Scand Suppl.* **363**:25-30.

**Boles BR, Thoendel M, Singh PK.** 2004. Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 16630-16635.

**Bottone EJ, Perez AA 2nd.** 1993. *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis acquired through use of a contaminated loofah sponge: an unrecognized potential public health problem. *J Clin Microbiol* **31**: 480-483.

**Bragonzi A, Worlitzsch D, Pier GB, Timpert P, Ulrich M, Hentzer M, Andersen JB, Givskov M, Conese M, Doring G.** 2005. Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model. *J Infect Dis* **192**: 410-419.

**Breidenstein EBM, Khaira BK, Wiegand I, Overhage J, Hancock REW.** 2008. Complex ciprofloxacin resistance revealed by screening a *Pseudomonas aeruginosa* mutant library for altered susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(12): 4486-4491.

**Brown EW, LeClerc JE, Baoguang L, Payne WL, Cebula TA.** 2001. Phylogenetic evidence for horizontal transfer of *mutS* alleles among naturally occurring *Escherichia*

*coli* strains. J Bacteriol **183**: 1631-1644.

**Bullock WO, Fernández JM, Short JM.** 1987. XL1 Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. BioTechniques **5**:376-378.

**Campodónico VL, Gadjeva M, Paradis-Bleau C, Uluer A, Pier GB.** 2008. Airway epithelial control of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Trends Mol Med **14**(3): 120-133.

**Campoy S, Pérez de Rozas AM, Barbé J, Badiola I.** 2000. Virulence and mutation rates of *Salmonella typhimurium* strains with increased mutagenic strength in a mouse model. FEMS Microbiol Lett **187**(2): 145-150.

**Cantin AM, Woods DE.** 1999. Aerosolized prolactin suppresses bacterial proliferation in a model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. Am J Respir Crit Care Med **160**(4): 1130-1135.

**Cantón R, Oliver A, Baquero F.** Microbiología de las vías respiratorias en la fibrosis quística. *En Fibrosis Quística, atención integral, manejo clínico y puesta al día.* FJ Dapena Fernández (Ed). 1998.

**Carnoy C, Scharfman A, Van Brussel E, Lamblin G, Ramphal R, Roussel P.** 1994. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane adhesins for human respiratory mucus glycoproteins. Infect Immun **62**: 1896-1900.

**Cash HA, Woods DE, McCullough B, Johanson WG Jr, Bass JA.** 1979. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Am Rev Respir Dis **119**: 453-459.

**Cheng PW, Boat TF, Cranfill K, Yankaskas JR, Boucher RC.** 1989. Increased sulfation of glycoconjugates by cultured nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. J Clin Invest **84**(1):68-72.

**Cheung AT, Moss RB, Kurland G, Leong AB, Novick WJ Jr.** 1993. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* endobronchitis in rhesus monkeys: II. A histopathologic analysis. J Med Primatol **22**(4):257-262.

**Chopra I, O'Neill AJ, Miller K.** 2003. The role of mutators in the emergence of

antibiotic-resistant bacteria. Drug Resist Updat **6**: 137-45.

**Chronos ZC, Wert SE, Livingston JL, Hasset DJ, Whitsett JA.** 2000. Role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in vivo. J Immuno **165**: 3941-3950.

**Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Hoiby N.** 2005. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. Antimicrob Agents Chemother **49**: 2276-2282.

**Clifton IJ, Kastelik JA, Peckham DG, Hale A, Denton M, Etherington C, Conway SP.** 2007. Ten years of viral and non-bacterial serology in adults with cystic fibrosis. Epidemiol Infect **12**: 1-7.

**Coburn J, Frank DW.** 1999. Macrophages and epithelial cells respond differently to *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. Infect Immun **67**: 3151-3154.

**Cohen ML.** 1986. *Staphylococcus aureus*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. J Pediatr **108**: 796-799.

**Coleman FT, Mueschenborn S, Meluleni G, Ray C, Carey VJ, Vargas SO, Cannon CL, Ausubel FM, Pier GB.** 2003. Hypersusceptibility of cystic fibrosis mice to chronic *Pseudomonas aeruginosa* oropharyngeal colonization and lung infection. Proc Natl Acad Sci USA **100**: 1949-1954.

**Conrad RS, Galanos C.** 1989. Fatty acid alterations and polymyxin B binding by lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* adapted to polymyxin B resistance. Antimicrob Agents Chemother **33**: 1724-1728.

**Costerton, JW, Stewart PS, Greenberg EP.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science **284**: 1318-1322.

**Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG.** 2004. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol **42**(12):5644-5649.

**Cystic Fibrosis Foundation.** Patient Registry 2006 Annual Data Report. Bethesda, Maryland: Cystic Fibrosis Foundation; 2007.

**D'Argenio DA, Wu M, Hoffman LR, Kulasekara HD, Déziel E, Smith EE, Nguyen H, Ernst RK, Larson Freeman TJ, Spencer DH, Brittnacher M, Hayden HS, Selgrade S, Klausen M, Goodlett DR, Burns JL, Ramsey BW, Miller SI.** 2007. Growth phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants adapted to the airways of cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* **64**: 512-533.

**Damagnez V, Doutriaux MP, Radman M.** 1989. Saturation of mismatch repair in the *mutD5* mutator strain of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**(8):4494-4497.

**Dapena Fernández FJ.** Fibrosis Quística, atención integral, manejo clínico y puesta al día. 1998.

**Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M, Lechtzin N, Boyle MP.** 2008. Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **178**(8):814-821.

**Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greeberg EP.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**: 295-297.

**Davies JC, Rubin BK.** 2007. Emerging and unusual gram-negative infections in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* **28**(3):312-321.

**De Champs C, Rich C, Chandezon P, Chanal C, Sirot D, Forestier C.** 2004. Factors associated with antimicrobial resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: 1-year survey in a French university hospital. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis* **23**: 456-457.

**Del Campo R, Moronsini MI, De la Pedrosa EG, Fenoli A, Muñoz-Almagro C, Máiz L, Baquero F, Cantón R; Spanish Pneumococcal Infection Study Network.** 2005. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **43**: 2207-2214.

**Denamur E, Lecointre G, Darlu P, Tenailon O, Acquaviva C, Sayada C.** 2000. Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell* **103**: 711-721.

**Denamur E., Matic I.** 2006. Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol. Microbiol.* **60**: 820-827.

**Dorin JR, Dickinson P, Alton EFWF, Smith SN, Geddes DM, Stevenson BJ, Kimber WL, Fleming S, Clarke AR, Hooper ML, Anderson L, Beddington RSP, Porteous DJ.** 1992. Cystic fibrosis in the mouse by targeted insertional mutagenesis. *Nature (London)* **359**: 211-214.

**Driffield K, Miller K, Bostock JM, O'Neill AJ, Chopra I.** 2008. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother* **61**(5):1053-1056.

**Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM.** 1990. Correction of the cystic fibrosis defect in vitro by the retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* **62**: 1227-1233.

**Echols, H, Lu C, Burgers PMJ.** 1983. Mutator strains of *Escherichia coli*, *mutD* and *dnaQ*, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 2189-2192.

**Eifrig CW, Scott IU, Flynn HW Jr.** 2003. Endophthalmitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Ophthalmology* **110**: 1714-1717.

**Elizur A, Orscheln RC, Ferkol TW, Atkinson JJ, Dunne WM Jr, Buller RS, Armstrong JR, Mardis ER, Storch GA, Cannon CL.** 2007. Panton-Valentine Leukocidin-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* lung infections in patients with cystic fibrosis. *Chest* **131**(6):1718-1725.

**Ernst RK, Yi EC, Guo L, Lim KB, Burns JL, Hackett M, Miller SI.** 1999. Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**: 1561-1565.

**Fajardo A, Martínez-Martín N, Mercadillo M, Galán JC, Ghysels B, Matthijs S, Cornelis P, Wiehlmann L, Tümmler B, Baquero F, Martínez JL.** 2008. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PloS One* **3**(2): e1619.

**Feldman M, Bryan R, Rajan S.** 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* **66**: 43-51.

**Finck-Barbancon V, Goranson J, Zhu L.** 1997. ExoU expression by *Pseudomonas*

*aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. Mol Microbiol **25**: 547-557.

**Foca M, Jakob K, Whittier S, Della Latta P, Factor S, Rubenstein D, Saiman L.** 2000. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* infection in a neonatal intensive care unit. N Engl J Med **343**: 695-700.

**Frithz-Lindsten E, Holmstrom A, Jacobsson L.** 1998. Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and PopD/YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. Mol Microbiol **29**: 1155-1165.

**Funchain P, Yeung A, Stewart J, Clendenin WM, Miller JH.** 2001. Amplification of mutator cells in a population as a result of horizontal transfer. J Bacteriol **183**: 3737-3741.

**Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP.** 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annu Rev Microbiol **50**: 727-751.

**Galan JE, Collmer A.** 1999. Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. Science **284**: 1322-1328.

**Gambello MJ, Iglewski BH.** 1991. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa lasR* gene: a transcriptional activator of elastase expression. J Bacteriol **173**: 3000-3009.

**Gambello MJ, Kaye S, Iglewski BH.** 1993. LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. Infect Immun **61**: 1180-1184.

**García-Castillo M, Morosini MI, Valverde A, Almaraz F, Baquero F, Cantón R, del Campo R.** 2007. Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis samples and blood cultures. J Antimicrob Chemother **59**(2):301-304.

**Geddes DM.** 1988. Antimicrobial therapy against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Pseudomonas cepacea*. Chest **94**(Suppl.): 1405-1445.

**Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, Palepou**

- MF, Woodford N.** 2002. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*(IMP) allele, *bla*(IMP-7). *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 255-258.
- Gibson RL, Burns JL, Rammsey BW.** 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **168**: 918-951.
- Gilligan PH.** 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **4**: 35-51.
- Giraud A, Matic I, Tenailon O, Clara A, Radman M, Fons M, Taddei F.** 2001. Costs and benefits of high mutation rates: Adaptive evolution of bacteria in the mouse gut. *Science* **291**: 2606-2608.
- Giwerzman B, Lambert P, Rosdahl VT, Shand GH, Hoiby N.** 1990. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed  $\beta$ -lactamase producing strains. *J Antimicrob Chemother* **26**: 247-259.
- Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM.** 1997. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* **88**: 553-560.
- Govan JR, Deretic V.** 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**: 539-574.
- Guilbault C, Martin P, Houle D, Boghdady ML, Guiot MC, Marion D, Radzioch D.** 2005. Cystic fibrosis lung disease following infection with *Pseudomonas aeruginosa* in Cfr knockout mice using novel non-invasive direct pulmonary infection technique. *Lab Anim* **39**(3):336-352.
- Gupta SK, Berk RS, Masinick S, Hazlett LD.** 1994. Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun* **62**: 4572-4579.
- Gutiérrez O, Juan C, Pérez JL, Oliver A.** 2004. Lack of association between hypermutation and antibiotic resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care unit patients. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3573-3575.

**Hancock RE, Mutharia LM, Chan L, Darveau RP, Speert DP, Pier GB.** 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun* **42**: 170-177.

**Hart DA, Green F, Whidden P, Henkin J, Woods DE.** 1993. Exogenous rh-urokinase modifies inflammation and *Pseudomonas aeruginosa* infection in a rat chronic pulmonary infection model. *Can J Microbiol* **39**(12):1127-1134.

**Hatch RA, Schiller NL.** 1998. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**: 974-977.

**Hatchette TF, Gupta R, Marrie TJ.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia in previously healthy adults: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* **31**: 1349-1356.

**Häußler S, Tümmler B, Weissbrodt H, Rohde M, Steinmetz I.** 1999. Small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* **29**: 621-625

**Häußler S, Ziegler I, Löttel A, Götz FV, Rohde M, Wehmhöner D, Saravanamuthu S, Tümmler B, Steinmetz I.** 2003. Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *J Med Microbiol* **52**: 295-301.

**Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underrhill DM, Aderem A.** 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**(6832):1099-1103.

**He J, Baldini RL, Déziel E, Saucir M, Zhang Q, Libertari NT, Lee D, Urbach J, Goodman HM, Rahme LC.** 2004. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2530-2535.

**Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B.** 2007. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(11): 4062-4070.

**Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, Kumar N,**

**Schembri MA, Song Z, Kristoffersen P, Manefield M, Costerton JW, Molin S, Eberl L, Steinberg P, Kjelleberg S, Høiby N, Givskov M.** 2003. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBO J* **22**(15):3803-3815.

**Henwood CJ, Livermore DM, James D, Warner M and the Pseudomonas study group.** 2001. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British society for antimicrobial chemotherapy disc susceptibility test. *J Antimicrob Chemother* **47**: 789-799.

**Hern JD, Almeyda J, Thomas DM.** 1996. Malignant otitis externa in HIV and AIDS. *J Laryngol Otol* **110**: 770-775.

**Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA.** 2000. Markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* **109**: 288-295.

**Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S, Gibson BW, Miller SI.** 2006. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(52): 19890-19895.

**Hoffmann N, Rasmussen TB, Jensen PO, Stub C, Hentzer M, Molin S, Ciofu O, Givskov M, Johansen HK, Hoiby N.** 2005. Mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infect Immun* **73**: 2504-2514.

**Hoffmann N, Lee B, Hentzer M, Rasmussen TB, Song Z, Johansen HK, Givskov M, Høiby N.** 2007. Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in *Cftr(-/-)* mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2007 **51**(10):3677-3687.

**Hoffman LR, Kulasekara HD, Emerson J, Houston LS, Burns JL, Ramsey BW, Miller SI.** 2009. *Pseudomonas aeruginosa lasR* mutants are associated with cystic fibrosis lung disease progression. *J Cyst Fibros* **8**(1): 66-70.

**Hogardt M, Schubert S, Adler K, Götzfried M, Heesemann J.** 2006. Sequence variability and functional analysis of MutS of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates. *Int J Med Microbiol* **296**(4-5):313-320.

**Hogartdt M, Hoboth C, Schmoltdt S, Henke C, Bader L, Heesemann J.** 2007. Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. *J Infect Diseases* **195**:70-80.

**Holland SP, Pulido JS, Shires TK, Costerton JW.** 1993. *Pseudomonas aeruginosa* ocular infections, p 159-176. *En* RB Fick Jr (ed): *Pseudomonas aeruginosa: the Opportunist*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Fla.

**Holt JG, Kreig NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST.** 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed. 93-94, 151-168. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.

**Horst JP, Wu TH, Marinus MG.** 1999. *Escherichia coli* mutator genes. *Trends Microbiol.* **7**: 29-36.

**Hurley JC, Miller GH, Smith AL.** 1995. Mechanism of amikacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* **22**: 331-336.

**Imamura Y, Yanagihara K, Tomono K, Ohno H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Kadota J, Tsukamoto K, Kohno S.** 2005. Role of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems in a mouse model of chronic respiratory infection. *J Med Microbiol* **54**(Pt 6):515-518.

**Imundo L, Barasch J, Prince A, Al-awqati A.** 1995. Cystic fibrosis epithelial cells have a receptor for pathogenic bacteria on their apical surface. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 3019-3023.

**Iwata M, Sato A.** 1991. Morphological and immunohistochemical studies of the lungs and bronchus-associated lymphoid tissue in a rat model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 1991 **59**(4):1514-1520.

**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.

**Jalal S, Ciofu O, Hoiby N, Gotoh N, Wretlind B.** 2000. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 710-712.

**Jelsbak L, Johansen HK, Frost AL, Thøgersen R, Thomsen LE, Ciofu O, Yang L, Haagenzen JA, Høiby N, Molin S.** 2007. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun.* **75**(5):2214-2224.

**Jensen PØ, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, Moser C, Williams P, Pressler T, Givskov M, Høiby N.** 2007. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **153**(Pt 5):1329-1338.

**Johansen HK, Hougen HP, Cryz SJ Jr, Rygaard J, Høiby N.** 1995. Vaccination promotes TH1-like inflammation and survival in chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **152**(4 Pt 1):1337-1346.

**Johansen HK.** 1996. Potential of preventing *Pseudomonas aeruginosa* lung infections in cystic fibrosis patients: experimental studies in animals. *APMIS Suppl* **63**:5-42.

**Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A.** 2006. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(5):1780-1787.

**Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL, Bou G, Oliver A.** 2008. Characterization of the new metallo- $\beta$ -lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(10): 3589-3596.

**Kenna DT, Doherty CJ, Foweraker J, Macaskill L, Barcus VA, Govan JRW.** 2007. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology* **153**: 1852-1859.

**Kent G, Iles R, Bear CE, Huan LJ, Griesenbach U, McKerlie C, Frndova H, Ackerley C, Gosselin D, Radzioch D, O'Brodovich H, Tsui LC, Buchwald M, Tanswell AK.** 1997. Lung disease in mice with cystic fibrosis. *J Clin Invest* **100**(12):3060-3069.

**Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC.** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**: 1073-1080.

**Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J.** 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect* **36**(2):78-91.

**Kiska DL, Gilligan PH.** 2003. *Pseudomonas*, p 719-728. En PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Tenover y RH Tenover (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.

**Komshian SV, Tablan OC, Palutke W, Reyes MP.** 1990. Characteristics of left-sided endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa* in the Detroit Medical Center. *Rev Infect Dis* **12**: 693-702.

**Konstan MW, Vargo KM, Davis PB.** 1990. Ibuprofen attenuates the inflammatory response to *Pseudomonas aeruginosa* in a rat model of chronic pulmonary infection. Implications for antiinflammatory therapy in cystic fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **141**(1): 186-192.

**Kounnas MZ, Morris RE, Thompson MR, FitzGerald DJ, Strickland DK, Saelinger CB.** 1992. The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *J Biol Chem* **267**: 12420-12423.

**Kresse AU, Dinesh SD, Larbig K, Römling U.** 2003. Impact of large chromosomal inversions on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Mol Microbiol* **47**(1):145-158.

**Labat F, Pradillon O, Garry L, Peuchmaur M, Fantin B, Denamur E.** 2005. Mutator phenotype confers advantage in *Escherichia coli* chronic urinary tract infection pathogenesis. *FEMS Immunol. Med Microbiol* **44**: 317-321.

**Lamers MH, Perrakis A, Enzlin JH, Winterwerp HH, de Win N, Sixma TK.** 2000. The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a GT mismatch. *Nature* **407**: 711-717.

**Lange KH, Hougen HP, Høiby N, Fomsgaard A, Rygaard J, Johansen HK.** 1995. Experimental chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in rats. Non-specific stimulation with LPS reduces lethality as efficiently as specific immunization. *APMIS* **103**(5):367-374.

**Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F.** 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends Mol Med **10**: 599-606.

**Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Guan XY, Zhang J, Meltzer PS, Yu JW, Kao FT, Chen DJ, Cerosaletti KM, Fournier REK, Todd S, Lewis T, Leach RJ, Naylor SL, Weissenbach J, Mecklin JP, Järvinen H, Petersen GM, Hamilton SR, Green J, Jass J, Watson P, Lynch HT, Trent JM, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B.** 1993. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell **75**: 1215-1225.

**LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA.** 1996. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. Science **274**: 1208-1211.

**Lee VT, Smith RS, Tummler B, Lory S.** 2005. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. Infect Immun **73**: 1695-1705.

**Lieberman D, Lieberman D.** 2003. Pseudomonal infections in patients with COPD: epidemiology and management. Am J Respir Med **2**: 459-468.

**Livermore DM.** 1995. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev **8**: 557-584.

**Livermore DM, Woodford N.** 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? Curr Opin Microbiol **3**: 489-495.

**Livermore DM.** 2002. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? Clin Infect Dis **34**: 634-640.

**Lodge JM, Minchin SD, Piddock LJV, Busby SJW.** 1990. Cloning sequencing and analysis of the structural gene and regulatory region of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal AmpC  $\beta$ -lactamase. Biochem J **272**: 627-631.

**Lujan AM, Moyano AJ, Segura I, Argarana CE, Smania AM.** 2007. Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa mutS* strain. Microbiology **153**: 225-237.

**Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB.** 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa*

infections: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* **2**: 1051-1060.

**Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB.** 2002. Lung infection associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Revs* **15**: 194-222.

**Lynch JP.** 2001. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest* **119** (suppl 2): S373-S384.

**Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Pérez JL, Oliver A.** 2005. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 3382-3386.

**Macia MD, Borrell N, Perez JL, Oliver A.** 2004. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2665-2672.

**Macia MD, Borrell N, Segura M, Gómez C, Perez JL, Oliver A.** 2006. Efficacy and potential for resistance selection of antipseudomonal treatments in a mouse model of lung infection by hypermutable *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 975-983

**Mah TFC, O'Toole GA.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* **9**: 34-39.

**Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP.** 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* **62**: 596-605.

**Mao EF, Lane L, Lee J, Miller JH.** 1997. Proliferation of mutators in a cell population. *J Bacteriol* **179**: 417-422.

**Marx CJ, Lidstrom ME.** 2002. Broad-host-range cre-lox system for antibiotic marker recycling in gram-negative bacteria. *Biotechniques* **33**(5):1062-1067.

**Mathee K, Narasimhan G, Valdes C, Qiu X, Matewish JM, Koehrsen M, Rokas A, Yandava CN, Engels R, Zeng E, Olavarietta R, Doud M, Smith RS, Montgomery P, White JR, Godfrey PA, Kodira C, Birren B, Galagan JE, Lory S.** 2008. Dynamics of

*Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **105**: 3100-3105.

**Matic I, Rayssiguer C, Radman M.** 1995. Interspecies gene exchange in bacteria: The role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. Cell **80**: 507-515.

**Matic I, Radman M, Taddei F, Picard B, Doit C, Bingen E, Denamur E, Elion J.** 1997. High variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. Science **277**: 1833-1834.

**Mayer KH.** 1986. Review of epidemic aminoglycoside resistance worldwide. Am J Med **80**: 56-64.

**Mayhall CG.** 1997. Nosocomial pneumonia. Diagnosis and prevention. Infect Dis Clin North Am **11**: 427-457.

**McCray PB Jr, Zabner J, Jia HP, Welsh MJ, Thorne PS.** 1999. Efficient killing of inhaled bacteria in DeltaF508 mice: role of airway surface liquid composition. Am J Physiol **277**(1 Pt 1):L183-190.

**McMorran B, Town L, Costelloe E.** 2003. Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. Infect Immun **71**: 6035-6044.

**Merino D, Reglier-Poupet H, Berche P, Charbit A and European Listeria Genome Consortium.** 2002. A hypermutator phenotype attenuates the virulence of *Listeria monocytogenes* in a mouse model. Mol Microbiol **44**: 877-887.

**Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA.** 1996. Pyoverdinin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun **64**: 518-523.

**Michel BC.** 1988. Antibacterial therapy in cystic fibrosis: a review of the literature published between 1980 and February 1987. Chest **94**(Suppl.): 1295-1315.

**Miller MB, Gilligan PH.** 2003. Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol **41**: 4009-4015.

**Miller JH.** 1996. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. Annu Rev Microbiol **50**:625-643.

- Molina A, Del Campo R, Máiz L, Morosini MI, Lamas A, Baquero F, Cantón R.** 2008. High prevalence in cystic fibrosis patients of multiresistant hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST228-SCCmecI capable of biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* **62**(5):961-967.
- Montanari S, Oliver A, Salerno P, Mena A, Bertoni G, Tümmler B, Cariani L, Conese M, Döring G, Bragonzi A.** 2007. Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* **153**(Pt5): 1445-1454.
- Montie TC, Doyle-Huntzinger D, Craven RC.** 1982. Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infect Immun* **38**: 1296-1298.
- Morissette C, Skamene E, Gervais F.** 1995. Endobronchial inflammation following *Pseudomonas aeruginosa* infection in resistant and susceptible strains of mice. *Infect Immun* **63**(5):1718-1724.
- Morrison AJ Jr, Wenzel RP.** 1984. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* **6** (suppl 3): S627-S642.
- Moskwa P, Lorentzen D, Excoffon KJ, Zabner J, McCray PB Jr, Nauseef WM, Dupuy C, Bánfi B.** 2007. A novel host defense system of airways is defective in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **175** (2): 174-183.
- Mousa HA.** 1997. Aerobic, anaerobic and fungal burn wound infections. *J Hosp Infect* **37**: 317-323.
- Moyano AJ, Luján AM, Argaraña CE, Smania AM.** 2007. MutS deficiency and activity of the error-prone DNA polymerase IV are crucial for determining *mucA* as the main targeted for mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **64**(2): 547-559.
- Mulcahy H, O'Callaghan J, O'Grady EP, Maciá MD, Borrell N, Gómez C, Casey PG, Hill C, Adams C, Gahan CG, Oliver A, O'Gara F.** 2008. *Pseudomonas aeruginosa* RsmA plays an important role during murine infection by influencing colonization, virulence, persistence, and pulmonary inflammation. *Infect Immun* **76**(2): 632-638.
- Mulet X, Maciá MD, Mena A, Juan C, Pérez JL, Oliver A.** 2009. Azithromycin in

*Pseudomonas aeruginosa* biofilms: bactericidal activity and selection of *nfxB* mutants. Antimicrob Agents Chemother **53**(4): 1552-1560.

**Naas T, Nordmann P.** 1999. OXA-type beta-lactamases. Curr Pharm Des **5**: 865-879.

**Nacucchio MC, Cerguetti MC, Meiss RP, Sordelli DO.** 1984. Short communication. Role of agar beads in the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* in the rat respiratory tract. Pediatr Res **18**(3): 295-296.

**Nagata T, Mukae H, Kadokawa T, Kaida H, Kuroki M, Yanagihara K, Asano K, Kadota J, Koji T, Kawano S.** 2003. [Long-term effect of erythromycin therapy on *Pseudomonas aeruginosa* in chronic murine model of pseudomonas pulmonary infection]. Jpn J Antibiot **56**(Suppl A): 57-59.

**Nagata T, Mukae H, Kadota J, Hayashi T, Fujii T, Kuroki M, Shirai R, Yanagihara K, Tomono K, Koji T, Kohno S.** 2004. Effect of erythromycin on chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an experimental murine model. Antimicrob Agents Chemother **48**(6):2251-2259.

**Nilsson AI, Kugelberg E, Berg OG, Andersson DI.** 2004. Experimental adaptation of *Salmonella typhimurium* to mice. Genetics **168**:1119-1130.

**Normark BH, Normark S.** 2002. Evolution and spread of antibiotic resistance. J Intern Med **252**(2): 91-106.

**O'Hara K.** 1993. Two different types of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett **15**: 9-16.

**O'Toole GA, Kolter R.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol **30**: 295-304.

**Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J.** 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **176**: 2044-2054.

**Ochner UA, Reiser J.** 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA **92**: 6424-6428.

**Oliver AM, Weir DM.** 1985. The effect of *Pseudomonas aeruginosa* alginate on rat alveolar macrophage phagocytosis and bacterial opsonization. *Clin Exp Immunol* **59**: 190-196.

**Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blázquez J.** 2004. Hypermutation and the pre-existence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4226-4233.

**Oliver A, Baquero F, Blázquez J.** 2002 [a]. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol* **43**: 1641-1650.

**Oliver A., Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J.** 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**: 1251-1253.

**Oliver A, Sanchez JM, Blazquez J.** 2002 [b]. Characterization of the GO system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **217**(1): 31-35.

**Oliver A, Mena A, Maciá MD.** Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity: from acute to chronic infections. *In: Evolutionary biology of bacterial and fungal pathogens*. Ed: Baquero F, Nombela C, Cassell GH, and Gutiérrez JA. ASM 2007.

**Pal C, Maciá MD, Oliver A, Schachar I, Buckling A.** 2007. Coevolution with viruses drives evolution of bacterial mutations rates. *Nature* **450**: 1079-1081.

**Palmer BR, Marinus MG.** 1994. The *dam* and *dcm* strains of *Escherichia coli*; a review. *Gene* **143**: 1-12.

**Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH.** 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* **260**: 1127-1130.

**Pearson JP, Gray KM, Passador L, Tucker KD, Eberhard A, Iglewski BH, Greenberg EP.** 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 197-201.

**Pearson JP, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP.** 1995. A second N-

acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA **92**: 1490-1494.

**Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH.** 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J Bacteriol **179**: 5756-5767.

**Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH.** 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. J Bacteriol **181**: 1203-1210.

**Pedersen S, Kharazmi SA, Espersen F, Hoiby N.** 1990. *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response. Infect Immun **58**: 3363-3368.

**Pennington JE, Hickey WF, Blackwood LL, Arnaut MA.** 1981. Active immunization with lipopolysaccharide *Pseudomonas* antigen for chronic *Pseudomonas* bronchopneumonia in guinea pigs. J Clin Invest **68**(5): 1140-1148.

**Pérez-Vázquez M, Román F, García-Cobos S, Campos J.** 2007. Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae* is associated with hypermutability. Antimicrob Agents Chemother **51**(4):1566-1569.

**Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH.** 1997. Regulation of *las* and *rhl* Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **179**: 3127-3132.

**Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH.** 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA **96**: 11229-11234.

**Pessi G, Haas D.** 2000. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhIR in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **182**(24): 6940-6949.

**Phaff SJ, Tiddens HA, Verbrugh HA, Ott A.** 2006. Macrolide resistance of *Staphylococcus aureus* and *Haemophilus* species associated with long-term azithromycin use in cystic fibrosis. J Antimicrobial Chemother **57**(4): 741-746.

**Phillips RM, Six DA, Dennis EA.** 2003. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with

phospholipase A2 inhibitors. *J Biol Chem* **278**: 41326-41332.

**Picard B, Duriez P, Gouriou S, Matic I, Denamur E, Taddei F.** 2001. Mutator natural *Escherichia coli* isolates have an unusual virulence phenotype. *Infect Immun* **69**: 9-14.

**Pier GB.** 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and targeted for effective immunity. *Int J Med Microbiol* **297**(5): 277-295.

**Pier GB.** 2000. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(16):8822-8828.

**Pier GB, Ames P.** 1984. Mediation of the killing of rough, mucoid isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis by the alternative pathway of complement. *J Infect Dis* **150**: 223-228.

**Pier GB, Grout M, Zaidi TS, Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR, Goldberg JB.** 1996. Role of mutant CFTR in hypersusceptibility of cystic fibrosis to lung infections. *Science* **271**: 64-67.

**Pierre M, Le Berre R, Tiesset H, Faure K, Guery B, Desseyn JL, Galabert C, Béghin L, Beermann C, Gottrand F, Husson MO.** 2008. [Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* virulence gene expression during chronic lung infection in the murine model]. *Med Mal Infect* **38**(6): 318-323.

**Poirel L, Girlich D, Naas T, Nordmann P.** 2001. OXA-28, an extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its plasmid- and integron-located gene. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 447-453.

**Pollack M.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa*, p 1980-2003. *En* GL Mandell, JE Bennett y R Dolin (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, Inc, New York, NY.

**Poole K.** 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**: 255-264.

**Potvin E, Sanschagrin F, Levesque RC.** 2008. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* **32**(1):38-55.

**Prunier AL, Malbruny B, Laurans M, Brouard J, Duhamel JF, Leclerc R.** 2003. High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains. *J Infect Dis* **187**: 1709-1716.

**Quénée L, Lamotte D, Polack B.** 2005. Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques* **38**(1): 63-67.

**Quinton PM.** 2008. Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis. *Lancet* **372**(9636):415-417.

**Rainey PB, Travisano M.** 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**: 69-72.

**Ramos HC, Rumbo M, Sirard JC.** 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* **12**(11): 509-517.

**Ratjen F, Doring G.** 2003. Cystic fibrosis. *Lancet* **22**: 681-689.

**Ress BD, Luntz M, Telischi FF.** 1997. Necrotizing external otitis in patients with AIDS. *Laryngoscope* **107**: 456-460.

**Ribeiro CM.** 2006. The role of intracellular calcium signals in inflammatory responses of polarised cystic fibrosis human airway epithelia. *Drugs R D* **7**(1):17-31.

**Richardson AR, Stojiljkovic I.** 2001. Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **40**: 645:655.

**Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou J, et al.** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066-1072.

**Robinson P.** 2001. Cystic fibrosis. *Thorax* **56**(3):237-241.

Rodríguez-Rojas A, Mena A, Martín S, Borrell N, Oliver A, Blázquez J. Inactivation of the hmgA gene of *Pseudomonas aeruginosa* leads to pyomelanin hyperproduction, stress resistance and increased persistence in chronic lung infection. *Mol Microbiol* (en prensa).

**Rodríguez-Rojas A, Blázquez J.** 2009. The *Pseudomonas aeruginosa* pfpl gene plays an antimutator role and provides general stress protection. *J Bacteriol* **191**(3): 844-850.

**Román F, Cantón R, Pérez-Vazquez M, Baquero F, Campos J.** 2004. Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol* **42**: 1450-1459.

**Römling U, Fiedler B, Bobhammer J, Grothues D, Greipel J, Von der Hart H, Tummler B.** 1994. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis* **170**: 1616-1621.

**Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N.** 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059-1065.

**Rosenfeld M, Ramsey BW, Gibson RL.** 2003. *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med* **9**: 492-497.

**Sajjan SU, Carmody LA, Gonzalez CF, LiPuma JJ.** 2008. A type IV secretion system contributes to intracellular survival and replication of *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun* **76**(12):5447-5455.

**Salyers AA, Whitt DD.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* and related species, a lesson in versatility, p 247-261. *En Bacterial pathogenesis: a molecular approach*, 2<sup>a</sup> ed. Salyers AA, Whitt DD (Eds). ASM, Washington, DC.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatic T.** 1989. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

**Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Franklin MJ.** 2005. Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **187**(13):4327-4337.

**Sato H, Frank DW, Hillard CJ.** 2003. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J* **22**: 2959-2969.

**Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* **184**: 1140-54.

**Savoia D, Zucca M.** 2007. Clinical and environmental *Burkholderia* strains: biofilm production and intracellular survival. *Curr Microbiol* **54**(6):440-4.

**Sawicki GS, Rasouliyan L, Pasta DJ, Regelman WE, Wagener JS, Waltz DA, Ren CL.** 2008. The impact of incident methicillin resistant *Staphylococcus aureus* detection on pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **43**(11):1117-23.

**Schulert GS, Feltman H, Rabin SD.** 2003. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis* **188**: 1695-1706.

**Schurek KN, Marr AK, Taylor PK, Wiegand I, Semene L, Khaira BK, Hancock REW.** 2008. Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(12): 4213-4219.

**Schuster M, Lostroh CP, Greenberg EP.** 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**(7): 2061-2065.

**Senda K, Arakawa Y, Nakashima K, Ito H, Ichiyama S, Shimokata K, Kato N, Ohta M.** 1996. Multifocal outbreaks of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* resistant to broad-spectrum beta-lactams, including carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 349-353.

**Sherbrock-Cox V, Russell NJ, Gacesa P.** 1984. The purification and chemical characterisation of the alginate present in extracellular material produced by mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Carbohydr Res* **135**(1): 147-154.

**Silo-Suh L, Suh S, Phibbis PV, Ohman DE.** 2005. Adaptations of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis lung environment can include deregulation of *zwf*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Bacteriol* **187**: 7561-7568.

**Simon R, Priefer U, Puhler A.** 1983. A broad range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:784-791.

**Simpson JA, Smith SE, Dean RT.** 1989. Scavenging by alginate of free radicals released by macrophages. *Free Radic Biol Med* **6**: 347-53.

**Smania AM, Segura I, Pezza RJ, Becerra C, Albesa I, Argaraña CE.** 2004. Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**: 1327-1338.

**Smith AW, Iglewski BH.** 1989. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res* **17**:10509.

**Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski BH.** 2002. The *Pseudomonas aeruginosa* Quorum-Sensing molecule N-(3-Oxodecanoyl) Homoserine Lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol* **184**:1132- 1139.

**Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachack C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV.** 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 8487-8492.

**Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP.** 1996. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria of abnormal airway surface fluid. *Cell* **85**: 229-236.

**Smith JJ.** 1996. How defective ion transport may lead to lung disease in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol Suppl* **S1**:3-5.

**Sniegowski PD, Gerrish PJ, Lenski RE.** 1997. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* **387**: 703-705.

**Soberon-Chavez G, Lepine F, Deziel E.** 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* **14**: 1-8.

**Song Z, Kharazmi A, Wu H, Faber V, Moser C, Krogh HK, Rygaard J, Hoiby N.** 1998. Effects of ginseng treatment on neutrophil chemiluminescence and immunoglobulin G subclasses in a rat model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**(6):882-887.

**Spencer DH, Kas A, Smith EE, Raymond CK, Sims EH, Hastings M, Burns JL, Kaul R, Olson MV.** 2003. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**: 1316-1325.

**Starke JR, Edwards MS, Langstonn C, Baker CJ.** 1987. A mouse model of chronic pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia*. *Pediatr*

Res 22:698-702.

**Starner TD, Zhang N, Kim G, Apicella MA, McCray PB Jr.** 2006. *Haemophilus influenzae* forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis. *Am Respir Crit Care Med* **174**(2): 213-220.

**Starner TD, Shrout JD, Parsek MR, Appelbaum PC, Kim G.** 2008. Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm formation and diminish established biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(1):137-145.

**Stevenson MM, Kondratieva TK, Apt AS, Tam MF, Skamene E.** 1995. In vitro and in vivo T cell responses in mice during bronchopulmonary infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Immunol* **99**(1): 98-105.

**Storey DG, Ujack EE, Rabin HR, Mitchell I.** 1998. *Pseudomonas aeruginosa lasR* transcription correlates with the transcription of *lasA*, *lasB*, and *toxA* in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. *Infect Immun* **66**: 2521-2528.

**Stotland PK, Radzioch D, Stevenson MM.** 2000. Mouse models of chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*: Models for the study of cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **30**(5):413-424.

**Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV.** 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**: 959-964.

**Sun J, Barbieri JT.** 2003. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT ADP-ribosylates CT10 regulator of kinase (Crk) proteins. *J Biol Chem* **278**: 32794-32800.

**Taddei, F., M. Radman, J. Maynard-Smith, B. Toupance, P. H. Gouyon, and B. Godelle.** 1997. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* **387**: 700-702.

**Tart AH, Wolfgang MC, Wozniak DJ.** 2005. The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of

*fleQ*. J Bacteriol **187**(23): 7955-7962.

**Taylor RF, Hodson ME, Pitt TL.** 1993 [a]. Adult cystic fibrosis: association of acute pulmonary exacerbations and increasing severity of lung disease with auxotrophic mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Thorax **48**: 1002-5.

**Taylor RF, Warner M, George RC, Hodson ME, Pitt TL.** 1993 [b]. Auxotrophic mutants of *Pseudomonas aeruginosa*: increased resistance to antipseudomonal antibiotics in cystic fibrosis. Med Microbiol Lett **2**: 25-32.

**Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol **33**: 2233-2239.

**Thomassen MJ, Klinger JD, Winnie GB, Wood RE, Burtner C, Tomashefski JF, Horowitz JG, Tandler B.** 1984. Pulmonary cellular response to chronic irritation and chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in cats. Infect Immun **45**(3):741-747.

**Toder DS, Ferrell SJ, Nezezon JL, Rust L, Iglewski BH.** 1994. *LasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. Infect Immun **62**: 1320-1327.

**Toder DS, Gambello MJ, Iglewski BH.** 1991. *Pseudomonas aeruginosa* LasA: a second elastase under the transcriptional control of *lasR*. Mol Microbiol **5**: 2003-2010.

**Tomich M, Griffith A, Herfst CA, Burns JL, Mohr CD.** 2003. Attenuated virulence of a *Burkholderia cepacia* type III secretion mutant in a murine model of infection. Infect Immun **71**(3): 1405-1415.

**Tramper-Stranders GA, Wolfs TF, Fler A, Kimpen JL, van der Ent CK.** 2007. Maintenance azithromycin treatment in pediatric patients with cystic fibrosis: long-term outcomes related to macrolide resistance and pulmonary function. Pediatr Infect Dis J **26**(1):8-12.

**Vahaboglu H, Ozturk R, Aygun G, Coskuncan F, Yaman A, Kaygusuz A, Leblebicioglu H, Balik I, Aydin K, Otkun M.** 1997. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and

*Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. Antimicrob Agents Chemother 41: 2265-2269. Erratum in: Antimicrob Agents Chemother **42**: 484.

**van Heeckeren A, Ferkol T, Tosi M.** 1998. Effects of bronchopulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* on adenovirus-mediated gene transfer to airway epithelial cells in mice. Gene Ther **5**(3): 345-351.

**van Heeckeren AM, Schluchter MD.** 2002. Murine models of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. Lab Anim **36**: 291-312.

**von Götz F, Häussler S, Jordan D, Saravanamuthu SS, Wehmhöner D, Strüßmann A, Lauber J, Attree I, Buer J, Tümmler B, Steinmetz I.** 2004. Expression analysis of a highly adherent and cytotoxic small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a lung of a patient with cystic fibrosis. J Bacteriol **186**(12):3837-3847.

**Ventre I, Goodman AL, Vallet-Gey I, Vasseur P, Soscia C, Molin S, Bleves S, Lazdunski A, Lory S, Filloux A.** 2006. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. Proc Natl Acad Sci USA **103**: 171-176.

**Vincent JL.** 2003. Nosocomial infections in adult intensive-care units. Lancet **361**: 2068-2077.

**Wagner VE, Bushnell D, Passador L, Brooks AI, Iglewski BH.** 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. J Bacteriol **185**(7): 2080-2095.

**Waine DJ, Honeybourne D, Smith EG, Whitehouse JL, Dowson CG.** 2008. Association between hypermutator phenotype, clinical variables, mucoid phenotype, and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol **46**(10): 3491-3493.

**Wang AG, Wu CC, Liu JH.** 1998. Bacterial corneal ulcer: A multivariate study. Ophthalmologica **212**: 126-132.

**Wareham DW, Curtis MA.** 2007. A genotypic and phenotypic comparison of type III secretion profiles of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis and bacteremia isolates. Int J Med Microbiol **297**(4):227-234.

**Watson ME, Burns JL, Smith AL.** 2004. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* **150**: 2947-2958.

**Welsh MJ, Quinton P.** 1996. High NaCl content of airway surface fluid in patients who have CF may inactivate endogenous lung defenses. Highlights from 10<sup>th</sup> North American cystic fibrosis conference 1996:7-8.

**West SE, Schweizer HP, Dall C, Sample AK, Runyen-Janecky LJ.** 1994. Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* **148**: 81-86.

**Whiteley M, Banger MG, Bumgamer RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S, Greenberg EP.** 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**: 860-4.

**Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP.** 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 13904-13909.

**Wieland CW, Siegmund B, Senaldi G, Vasil ML, Dinarello CA, Fantuzzi G.** 2002. Pulmonary inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide, phospholipase C, and exotoxin A: role of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun* **70**: 1352-1358.

**Wine JJ.** 2003. Rules of conduct for the cystic fibrosis anion channel. *Nat Med* **9**(7): 827-828.

**Winzer K, Falconer C, Garber NC, Diggle SP, Camara M, Williams P.** 2000. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* **182**(22): 6401-6411.

**Winson MK, Camara M, Latifi A, Foglino M, Chhabra SR, Daykin M, Bally M, Chapon V, Salmond GP, Bycroft BW.** 1995. Multiple N-acyl-L-homoserine lactone signal molecules regulate production of virulence determinants and secondary metabolites in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9427-9431.

**Woods DE, Cryz SJ, Friedman RL, Iglewski BH.** 1982. Contribution of toxin A and elastase to virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic lung infections of rats.

Infect Immun **36**(3): 1223-1228.

**Woods DE.** 2004. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. Trends Microbiol **12**(10):437-439.

**Yahr TL, Vallis AJ, Hancock MK, Barbieri JT, Frank DW.** 1998. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. Proc Natl Acad Sci USA **95**: 13899-13904.

**Yanagihara K, Tomono K, Kuroki M, Kaneko Y, Sawai T, Ohno H, Miyazaki Y, Higashiyama Y, Maesaki S, Kadota J, Kohno S.** 2000. Intrapulmonary concentrations of inflammatory cytokines in a mouse model of chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Exp Immunol **122**(1): 67-71.

**Yanagihara K, Tomono K, Imamura Y, Kaneko Y, Kuroki M, Sawai T, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mukae H, Kadota J, Kohno S.** 2002. Effect of clarithromycin on chronic respiratory infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* with biofilm formation in an experimental murine model. J Antimicrob Chemother **49**(5):867-870.

**Yanagihara K, Tomono K, Kaneko Y, Miyazaki Y, Tsukamoto K, Hirakata Y, Mukae H, Kadota J, Murata I, Kohno S.** 2003. Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis. J Med Microbiol **52**(Pt 6): 531-535.

**Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit TR, Garder PR, Schwab U, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock RE, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC, Hassett DJ.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms. Dev. Cell **3**: 593-610.

**Yu H, Hanes M, Chrisp CE, Boucher JC, Deretic V.** 1998. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: pulmonary clearance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and inflammation in a mouse model of repeated respiratory challenge. Infect Immun **66**: 280-288.

**Yu H, Nasr SZ, Deretic V.** 2000. Innate lung defenses and compromised *Pseudomonas aeruginosa* clearance in the malnourished mouse model of respiratory infections in cystic fibrosis. Infect Immun **68**(4):2142-2147.

**Zahrt TC, Buchmeier N, Maloy S.** 1999. Effect of *mutS* and *recD* mutations on *Salmonella* virulence. *Infect Immun* **67**: 6168-6172.

**Zhou L, Dey CR, Werst SE, Du Vall MD, Frizzell RA, Whitsett JA.** 1994. Correction of lethal intestinal defect in a mouse model of cystic fibrosis by human CFTR. *Science* **266**: 1705-1708.

**Zlosnik JE, Hird TJ, Fraenkel MC, Moreira LM, Henry DA, Speert DP.** 2008. Differential mucoid exopolysaccharide production by members of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol* **46**(4):1470-1473.



VIII. Anexo I:  
medios de cultivo y reactivos



## 1. Medios de cultivo (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra)

- **Caldo BHI (*Brain Heart infusion*):** 37g por litro de agua destilada.
- **Caldo LB (*Luria-Bertani*):** 5g NaCl, 5g extracto de levadura, 10g triptona por litro de agua destilada.
- **Agar LB:** 5g NaCl, 5g extracto de levadura, 10g triptona y 15g de agar bacteriológico nº1 por litro de agua destilada.
- **Caldo MH (*Müeller-Hinton*):** 21g por litro de agua destilada.
- **Agar MH:** 38g por litro de agua destilada.
- **Agar Pseudomonas:** 24,2g de agar base CM559 y 5ml de glicerina por 500ml de agua destilada, suplementado con C-N.

## 2. Reactivos para electroporación

- **SMEB:** 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM tampón Hepes (pH 7), 0,3M sacarosa.
- **SOB:** 2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>.
- **SOC:** se prepara a partir de SOB y 20mM glucosa.

## 3. Reactivos PFGE

- **PIV:** 10mM TRIS-HCl (pH 7,6), 1M NaCl.
- **Solución de lisis EC:** 6mM TRIS-HCl (pH 7,6), 1M NaCl, 100mM EDTA (pH 7,6), 0,5% Brij58, 0,2% desoxicolato, 0,5% sarcosil, 20mg/ml RNAsa, 100mg/ml lisozima.
- **ESP:** 0,5M EDTA (pH 9-9,5), 50µg/ml proteinasa K, 1% sarcosil.
- **TE:** 1mM EDTA (pH 7,6), 10mM TRIS-HCl ((pH 7,6).

● **Mezcla de restricción:**

Microorganismo	Enzima	Volumen por muestra (µl)			
		Enzima	Buffer(10X)	BSA (1%)	Agua
<i>E. coli</i> (marcador)	<i>Xba</i> I	20U	20	20	160
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Spe</i> I	20U	20	-	180

- **TBE 5X:** 54g de TRIS, 27,5g de ácido bórico y 20ml de EDTA 0,5M (pH 7,6), enrasado con agua destilada hasta 1 litro.

#### 4. Mezclas PCR

Reactivos	Volumen (µl) por reacción
DMSO	10
Buffer II (10X)	10
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	6
dNTPs (10mM cada uno)	2
Taq polimerasa (5 unidades/µl)	1
Cebador F (100 µM)	1
Cebador R (100 µM)	1
Agua destilada	69
ADN molde	1

\*Para un volumen final de 100µl por reacción

IX. Anexo II:  
artículos publicados



- **Mena A, Maciá MD, Borrell N, Moya B, de Francisco T, Pérez JL, Oliver A.** 2007. Inactivation of the Mismatch Repair System in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates virulence but favors persistence of oropharyngeal colonization in cystic fibrosis mice. J Bacteriol **189**(9):3665-3668.
  
- **Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, Oliver A.** 2008. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. J Bacteriol **190**(24):7910-7917.

