



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

**Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

**Determinación de la respuesta en IL-8 en células  
epiteliales infectadas por aislados secuenciales  
crónicos de *P. aeruginosa*.**

Marta Munar Bestard

**Grado en Bioquímica**

Año académico 2014-15

DNI del alumno: 43223886-D

Trabajo tutelado por Sebastián Albertí Serrano  
Departamento de Biología

Se autoriza a la Universidad a incluir mi trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con fines exclusivamente académicos y de investigación.

Palabras clave del trabajo:

***P. aeruginosa*, fibrosis quística, IL-8, respuesta inflamatoria, infección crónica.**



# Índice

1. Abstract/resumen .....	4
2. Introducción .....	5
2.1 Características generales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
2.2 Importancia clínica de <i>P. aeruginosa</i>	
2.3 Infecciones respiratorias crónicas causadas por <i>P. aeruginosa</i>	
2.4 La fibrosis quística (FQ)	
2.5 Principales factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	
2.6 Adaptaciones de <i>P. aeruginosa</i> durante el desarrollo de la infección crónica	
3. Objetivo.....	14
4. Materiales y métodos.....	14
4.1 Cepas bacterianas	
4.2 Cultivo celular	
4.3 Preparación de <i>P. aeruginosa</i> para el experimento	
4.4 Determinación de la producción de IL-8 en células epiteliales IB3-1	
5. Resultados y discusión .....	18
6. Conclusiones .....	24
7. Referencias .....	25

## 1. Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is the major cause of chronic lung infections in humans. During chronic infection, *P. aeruginosa* tends to lose some virulence factors and also tends to present a mucoid phenotype, and to develop resistance to antibiotics, among other features that make them adapt better to the environment of the lungs. IB3-1 epithelial cells isolated from a cystic fibrosis (CF) patient were infected with *P. aeruginosa* strains in 9 patients with CF. An early isolated and a late isolated *P. aeruginosa* was used for each patient. 55% of late *P. aeruginosa* isolates collected from patients were shown to have significantly reduced the induction of IL-8 by IB3-1 cells compared to initial isolates. Our results suggest that it is common in clinical isolates of *P. aeruginosa*, due to the loss of certain factors because of mutation during adaptation to the lungs with CF. Decreased immunostimulatory capabilities of the bacteria occur, which causes better adaptation, to stay unrecognised and activate the immune system to a lesser extent.

## Resumen

*Pseudomonas aeruginosa* es la causa principal de infecciones pulmonares crónicas en el ser humano. Durante la infección crónica, *P. aeruginosa* tiende a perder, ciertos factores de virulencia y también tiende a presentar un fenotipo mucoide, y a desarrollar resistencia a los antibióticos, entre otras características que le hacen adaptarse mejor al ambiente que supone el pulmón de los enfermos con fibrosis quística (FQ). Células epiteliales IB3-1 obtenidas de un paciente con FQ fueron infectadas con cepas bien caracterizadas de *P. aeruginosa* de 9 pacientes con FQ. Para cada paciente se utilizó un aislado inicial y un aislado tardío de *P. aeruginosa*. Un 55% de los aislados tardíos de *P. aeruginosa* recogidos de los pacientes mostraron haber reducido significativamente la capacidad para inducir la liberación de IL-8 por células epiteliales IB3-1, en comparación con los aislados iniciales. Nuestros resultados sugieren que es habitual que en las cepas clínicas de *P. aeruginosa*, debido a la pérdida por mutación de determinados factores durante el proceso de adaptación al pulmón con FQ, se produzca una disminución de las capacidades inmunoestimuladoras de la bacteria, lo que provoca mejor adaptación, al pasar más desapercibida y activar el sistema inmunológico en menor medida.

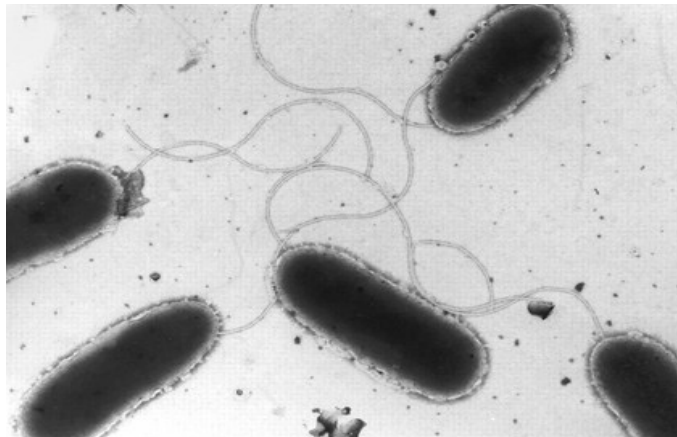
## 2. Introducción

### 2.1. Características generales de *Pseudomonas aeruginosa*

El género *Pseudomonas*, pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales* (1, 2).

Dentro del género *Pseudomonas*, de todas las especies conocidas, la más importante clínicamente es *Pseudomonas aeruginosa*, ya que posee la capacidad de producir infecciones de diversa gravedad en el ser humano, aunque sobretodo de tipo oportunista, como se verá más adelante (3).

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram-negativo no formador de esporas con una longitud comprendida entre 1,5 y 5  $\mu\text{m}$ , un diámetro entre 0,5 y 1  $\mu\text{m}$ . Habitualmente presenta un único flagelo polar que le confiere movilidad, aunque en algunas ocasiones se han observado aislados con dos o tres flagelos. La movilidad les confiere la capacidad de responder a estímulos químicos y así como localizar sustratos a bajas concentraciones (4).



**Figura 1.** Electromiografía que muestra el flagelo polar que presenta *P. aeruginosa*.

Posee un metabolismo respiratorio estricto con el oxígeno como aceptor final de electrones, si bien también puede utilizar los nitratos como tal en condiciones de anaerobiosis. Es oxidasa y catalasa positivo, y no fermentador de la lactosa.

Tiene una temperatura óptima de crecimiento entre 30-37°C, pero puede sobrevivir y multiplicarse en una gran rango de temperaturas (20-42°C), incluyendo ambientes ricos en sales. Determinadas cepas de *P. aeruginosa* también muestran cierto crecimiento a 4°C (5).

Una característica de *P. aeruginosa* común con los otros componentes del grupo fluorescente del género (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. veronii*, *P. monteilii*) es la producción de pigmentos que se tornan fluorescentes bajo la luz ultravioleta, como la pioverdina, de coloración amarillenta. Algunas cepas de *P. aeruginosa* producen además otros pigmentos que no generan las otras especies del género, como la piocianina (que junto con la pioverdina produce un color verde brillante muy característico), piorubina (rojo) o piomelanina (marrón o marrón oscuro). También existen cepas que no producen pigmento alguno, que se relacionan con aislados procedentes de pacientes con FQ (5).

*P. aeruginosa* presenta una morfología bastante heterogénea, habitualmente sus colonias son extensas, aplanadas, con bordes serrados y el crecimiento a menudo desprende un olor característico similar a fruta, y las colonias frecuentemente muestran un brillo metálico (5). Sin embargo, existen otros tipos de morfologías habitualmente relacionadas con infecciones pulmonares crónicas, como se verá más adelante.

Esta especie puede vivir en numerosos hábitats, que van desde diversos tipos ambientales acuáticos y terrestres, hasta tejidos diversos de animales y plantas, por lo tanto el hábitat primario es el ambiental (4). Debido a su capacidad de subsistir en ambientes acuosos con pocos nutrientes y su gran variabilidad metabólica, este microorganismo supone un grave problema en el ambiente hospitalario. En este contexto, *P. aeruginosa* se ha aislado en gran variedad de soluciones acuosas, incluyendo desinfectantes, jabones, fluidos para irrigación, colirios, fluidos para diálisis y aparatos hospitalarios (6, 7).

Pese a que no es habitual, *P. aeruginosa* también se puede aislar en la microbiota de algunos individuos sanos. En éstos, *P. aeruginosa* se detecta principalmente en su tubo digestivo, aunque también puede aislarse en otros lugares húmedos del cuerpo como en la orofaringe, la mucosa nasal, las axilas y el perineo. La tasa de colonización es mayor en pacientes

hospitalizados y/o inmunodeprimidos, en particular en aquellos pacientes que pasan elevados periodos de tiempo hospitalizados o que han recibido terapia antimicrobiana o quimioterapia previas (8, 9).

## **2.2. Importancia clínica de *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* es el patógeno humano más importante dentro de su género, tanto por la elevada diversidad de patologías que ocasiona como por la morbilidad y mortalidad de las mismas. A demás, la facilidad que presenta *P. aeruginosa* para crecer tanto en la naturaleza como en el ambiente nosocomial, le permite ser uno de los principales causante de infecciones oportunistas graves en el ser humano (8).

Las infecciones superficiales más corrientes provocadas por este patógeno son la foliculitis y la otitis. Otra infección más severa es la conocida como otitis maligna, en la que *P. aeruginosa* puede infectar tejidos más internos, llegando a dañar los nervios craneales y a producir osteomielitis en los huesos de la base del cráneo (7).

*P. aeruginosa* también puede causar infecciones oculares, principalmente en los usuarios de lentes de contacto con soluciones contaminadas. La infección puede causar daño corneal y hasta pérdida de la función ocular (10).

Aunque es poco frecuente, *P. aeruginosa* también puede causar neumonía adquirida en la comunidad. Afecta sobretodo a fumadores que han estado expuestos a aerosoles procedentes de dispositivos que pueden ser un gran reservorio de este microorganismo (11).

Sin embargo, donde más relevancia adquiere *P. aeruginosa*, es en el ambiente hospitalario, como se ha adelantado anteriormente. En este ambiente puede causar infecciones oportunistas inicialmente localizadas (como urinarias, de heridas quirúrgicas, quemaduras, etc), que ocasionalmente se pueden diseminar sistémicamente causando el consiguiente shock séptico. Ello se da principalmente en pacientes hospitalizados que poseen enfermedades de base como cáncer, diabetes, afecciones renales, pulmonares, etc...que implican habitualmente cierto nivel de inmunodepresión del paciente, a lo cual se suele unir el uso de técnicas o dispositivos

invasivos como sondas, catéteres, etc...factores que aumentan muchísimo el riesgo de infección por patógenos nosocomiales como es *P. aeruginosa*. La mortalidad en estos casos va desde un 5 a un 50% (12, 13).

En este sentido, donde adquiere más importancia *P. aeruginosa* es principalmente en los pacientes sometidos a ventilación asistida, causando la llamada neumonía asociada a la ventilación mecánica, *P. aeruginosa* es el principal causante de la misma, gracias a que el propio dispositivo de ventilación mecánica actúa como medio de entrada del patógeno en el árbol respiratorio inferior del paciente, que debe permanecer estéril en condiciones normales. La mortalidad ronda el 40 o 50 % (8, 12).

Finalmente, dentro de la importancia clínica de las infecciones por *P. aeruginosa* cabe destacar su enorme capacidad de desarrollo de resistencias a prácticamente todos los grupos de antibióticos usados hoy día, tanto por mutaciones como por la adquisición horizontal de determinantes de resistencia. Ello constituye un grave problema epidemiológico hoy día, pues el arsenal de fármacos útiles para tratar las infecciones por *P. aeruginosa* se ve cada vez más reducido.

También cabe destacar por último el papel de *P. aeruginosa* como agente causal de infecciones respiratorias crónicas, aspecto que será abordado en el siguiente punto (14).

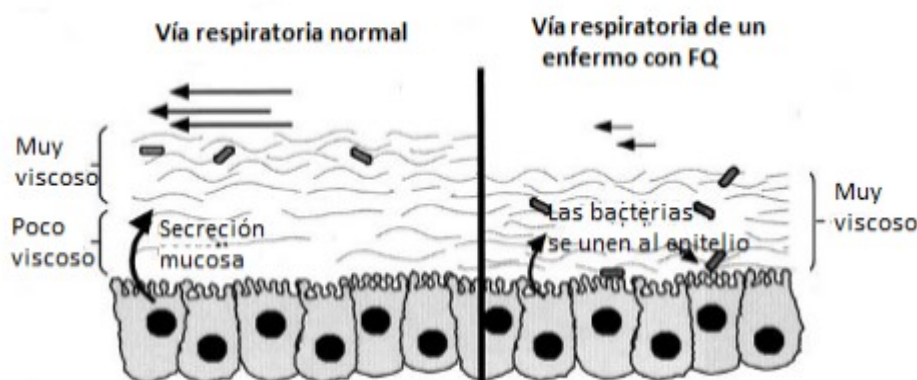
### **2.3. Infecciones respiratorias crónicas causadas por *P. aeruginosa***

*P. aeruginosa* es una de las principales causas de infecciones respiratorias crónicas en pacientes con enfermedades subyacentes tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquiectasias y sobre todo FQ. *P. aeruginosa* infecta crónicamente entre un 70 y un 80% de los pacientes adolescentes y adultos con FQ, en los que raramente se consigue eliminar la infección. Coloniza a los pacientes que padecen estas enfermedades crónicas debido a que su espacio bronquial y pulmonares es un nicho ecológico que desarrolla características ideales para su perpetuación (14).



## 2.4. La fibrosis quística (FQ)

La FQ es un trastorno hereditario, causado por una mutación en el gen que codifica la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis (CFTR) (15). La mutación en este gen induce una alteración en la secreción mucosa, provocando entre otros efectos, que las secreciones celulares, entre ellas el moco, sean más densas y viscosas (figura 2). Además, esta alteración genética produce un aumento en la reabsorción de cloro y sodio, y una escasa reabsorción del agua provocando una deshidratación en la superficie de las células epiteliales, causando el incorrecto deslizamiento del moco a través del sistema traqueobronquial. Esto conlleva a un estancamiento del moco, el cual servirá de caldo de cultivo ideal para la colonización microbiana y, por tanto, para las infecciones que tienden a convertirse en crónicas. A su vez, las bacterias, una vez colonizan el citado nicho, secretan diversas sustancias, que como el alginato contribuyen en la modificación del moco, haciéndolo aún más viscoso y denso (16).



**Figura 2.** Comparación de la depuración mucociliar en las vías respiratorias normales y en vías respiratorias de pacientes con FQ.

El epitelio normal de las vías respiratorias, está recubierto por un moco fluido que constituye una de las principales barreras antimicrobianas del tracto respiratorio. El epitelio ciliado transporta la secreción mucosa por el sistema traqueobronquial empujando a su paso cualquier microorganismo que pueda haber. Para que este mecanismo funcione correctamente, la secreción del moco tiene que tener una composición equilibrada de mucopolisacáridos y componentes serosos. En el lado derecho se representan las vías respiratorias de un enfermo con FQ, donde la capa de moco pasa a ser uniforme y no presenta una composición equilibrada, provocando que sea un nicho ideal para la colonización bacteriana (16).

## 2.5. Principales factores de virulencia de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* posee una gran variedad de factores de virulencia y complejos sistemas de control de la síntesis de los mismos que le permiten desarrollar un amplio abanico de infecciones descritas anteriormente (17).

Entre los factores de patogenicidad (que aparecen de modo resumido en la tabla 1), destacan:

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

Factor de patogenicidad	Función
Flagelos	Motilidad, quimiotaxis
Alginato	Adherencia, formación de biopelículas Evasión del sistema inmunitario
Pili	Adherencia, reconocimiento de receptores específicos
Lipopolisacárido (LPS)	Adherencia, efecto endotóxico, formación de inmunocomplejos
Exotoxina-A	Inhibición de la síntesis de proteínas
Exotoxina-S	Adherencia, inhibición de la síntesis de proteínas
Elastasas, proteasa	Interferencia con el sistema humoral y celular
Alcalina	Formación de inmunocomplejos. Actividad antiestafilocócica
	Degradación de colágeno, elastina, laminina y fibronectina Destrucción de los cilios de las células epiteliales respiratorias
Leucocidina	Citotoxina, incremento de la permeabilidad de membrana
Fosfolipasa C	Degradación de lecitina
Lipasa	Inhibición de quimiotaxis de monocitos
Ramno lipido	Estímulo del metabolismo oxidativo de monocitos
Pigmentos fenacínicos	Inhibición de la proliferación de linfocitos Modificación de funciones en polimorfonucleares Alteración de la función mucociliar de las células epiteliales Quelación de hierro
Sistemas de secreción tipo III	Interacción con la célula eucariota (activación de citoquinas y liberación de neutrófilos)

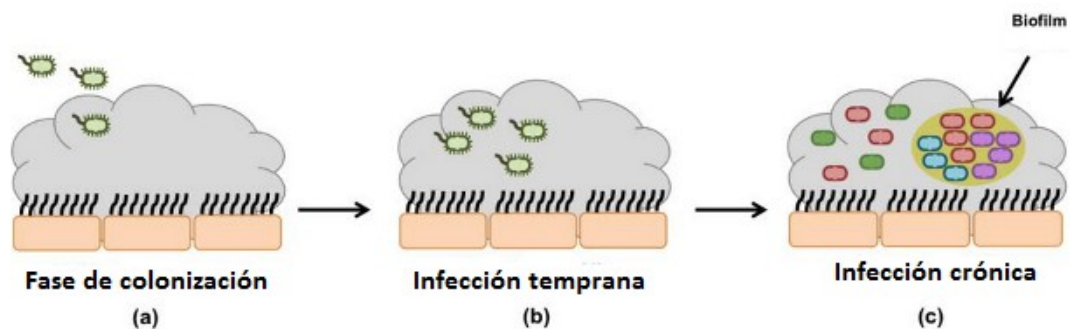
**-Adhesinas:** *P. aeruginosa* produce tres tipos de adhesinas: pili, flagelo y lipopolisacárido (LPS). Las primeras se caracterizan por adherir eficientemente la bacteria a las células epiteliales, los flagelos juegan un papel importante en la movilidad y quimiotaxis. Entre las adhesinas cabe destacar el LPS, que se une a una proteínas que actúa como canal de cloro de la membrana de las células del hospedador, denominada CFTR, citado anteriormente. Esta adhesión permite a la bacteria infectar a las células del epitelio pulmonar (18).

**-Toxinas:** En *P. aeruginosa* se han identificado cuatro tipos de toxinas que son inoculadas directamente desde su citoplasma al citoplasma de la célula hospedador, quedando así protegidas de la presencia de posibles anticuerpos. Este mecanismo se denomina sistema de secreción de tipo III y las 4 toxinas secretadas son Exo S, Exo T, Exo U y Exo Y, y están

implicadas en la inhibición de la fagocitosis, la promoción de destrucción tisular y el retardo en la curación de heridas. *P. aeruginosa* posee otras toxinas que no son secretadas por este mecanismo descrito, sino que son liberadas directamente por la bacteria al medio extracelular (sistema de secreción tipo II). La toxina más importante es la toxina A que inhibe la síntesis proteica en las células eucariotas y además posee también actividad inmunodepresora (19).

**-Otros factores extracelulares:** *P. aeruginosa* produce otros factores, como son la proteasa alcalina fosfolipasa C y el ramnolípido. Éstos causan daño en los pulmones de los pacientes con FQ (20).

**-Producción de alginato:** El alginato es un polímero de ácido manurónico y ácido gulurónico que *P. aeruginosa* produce en determinadas ocasiones y que forma un líquido viscoso alrededor de la bacteria. Las cepas productoras de este líquido tienen un aspecto mucoso característico. En el medio natural, el alginato permite a la bacteria la formación de biofilms sobre superficies inertes, pero también sobre el epitelio respiratorio. Se ha propuesto que actúa como barrera física para el acceso de antibióticos y componentes del sistema inmune humano a las bacterias, y también puede servir para dificultar la eliminación mecánica de las bacterias del pulmón (21). Se ha comprobado que hay una selección positiva en la producción de alginato en las bacterias que infectan crónicamente el pulmón de los pacientes con FQ: las colonias aisladas en las fases iniciales no son mucoides, y con el paso del tiempo y el desarrollo de la enfermedad van adquiriendo una morfología mucosa por selección de los mutantes hiperproductores de alginato (figura 3) (18, 23).

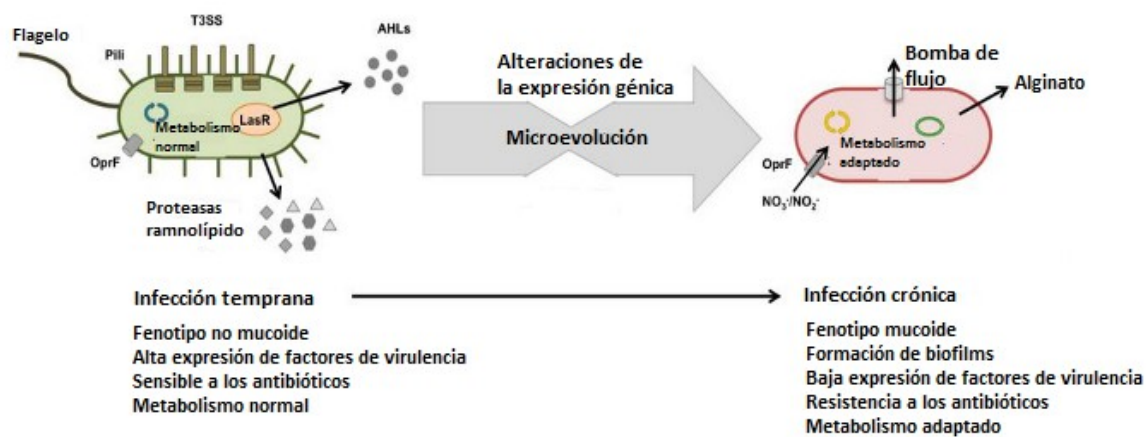


**Figura 3.** Evolución temporal de *P. aeruginosa* durante el desarrollo de la infección crónica. (A) Fase de colonización de la bacteria equipada con todos los factores de virulencia. (B) Representa la infección temprana cuando el patógeno empieza a adaptarse a las condiciones ambientales de la FQ. (C) Fase de infección crónica. *P. aeruginosa* está completamente adaptada al ambiente, gracias a la selección de mutaciones. En esta etapa, existe una alta diversidad fenotípica, genotípica y la formación de biofilms (22).

## 2.6. Adaptaciones de *P. aeruginosa* durante el desarrollo de la infección crónica

Una vez que se ha producido la infección pulmonar crónica por *P. aeruginosa*, es muy difícil de erradicar, pues la bacteria sufre un complejo proceso adaptativo al nuevo nicho ecológico (24).

El proceso de adaptación incluye tanto cambios fisiológicos como genéticos resumidos en la figura 4.



**Figura 4.** Representación del proceso adaptativo que sufre *P. aeruginosa* durante el desarrollo de la infección crónica. En la etapa temprana de la infección, *P. aeruginosa* está totalmente equipada con los principales factores de virulencia, incluidos los flagelos, pili, sistema de secreción tipo III, etc...y muestra sensibilidad a los antibióticos. En la etapa crónica de la infección, *P. aeruginosa* está totalmente adaptada al entorno de la FQ y exhibe una gran variedad de características fenotípicas causadas por la selección de mutaciones ventajosas, incluyendo la hiperproducción de alginato, la pérdida de los principales factores de virulencia implicados para el establecimiento inicial de la infección, la resistencia a antibióticos y un metabolismo adaptado (22).

Entre los primeros cabe destacar la transición desde el estado de crecimiento planctónico (células libres suspendidas en medio acuoso) al de crecimiento formando los denominados biofilms. Los biofilms son estructuras supracelulares (comunidades multicelulares) que representan un reservorio de alta diversidad fenotípica y es considerado uno de los mecanismos de adaptación más importantes (22, 23, 24). Los biofilms tienen una resistencia de naturaleza multifactorial que resulta de la combinación de varios mecanismos: crecimiento lento de las bacterias dentro del biofilm causados por una restricción en el acceso de nutrientes y oxígeno, impiden la penetración de los tratamientos antimicrobianos gracias a la

matriz de alginato, impiden la detección de moléculas de quorum sensing, así como la limitación de la penetración las defensas inmunitarias, todo ello confiriendo a *P. aeruginosa* una gran capacidad de persistencia en los pacientes con FQ (25).

Además del crecimiento en forma de biofilms, el desarrollo de la infección crónica por *P. aeruginosa* sufre un intenso proceso de adaptación genética, en otras palabras, de selección de mutaciones espontáneas que acaban siendo ventajosas para la bacteria, que será determinante para su resistencia a las condiciones ambientales.

Debido a esta adaptación surgen una gran cantidad de variantes fenotípicas características de la infección crónica, donde cabe destacar:

-Una mutación muy frecuente se produce en el gen *mucA*, que produce las cepas de morfología mucoide (comentadas en el apartado anterior) que se aíslan en un 80% de los pacientes con FQ. Esta morfología le otorga a las cepas un mayor facilidad para infectar crónicamente a los pacientes de FQ (21).

-Colonias enanas y puntiformes (“small colony variants”: SCV). Tienen un crecimiento más lento que el resto de cepas (24), característica que las hace menos sensibles a los antibióticos (26).

-La pérdida de los flagelos, del pili efector y del LPS, características muy frecuentes en aislados de FQ, que dificultan el reconocimiento y la fagocitosis por parte de las células del sistema inmunitario (27).

-Otra característica muy común es la resistencia a antibióticos debido a mutaciones que causan diversos mecanismos, como la hiperproducción de la beta-lactamasa cromosómica *AmpC*, reducción de la expresión de porinas, o una sobreexpresión de bombas de expulsión de antibióticos (28).

En definitiva, una de las vertientes más importantes que parecen tener las mutaciones seleccionadas durante la infección crónica, es la de hacer a la bacteria menos detectable por parte del sistema inmunitario, favoreciéndose así que pase desapercibida, y su perpetuación en el pulmón. Es por ello habitual que se seleccionen mutaciones relacionadas con la pérdida de factores proinflamatorios (y por tanto inmunoestimuladores), por parte de *P. aeruginosa* (24).

### 3. Objetivo

Investigar mediante una colección de aislados secuenciales de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ, si los cambios fenotípicos y genotípicos que sufren las cepas a lo largo de la infección crónica afectan a la inducción de la respuesta inflamatoria en células epiteliales IB3-1 (en forma de secreción de IL-8).

### 4. Materiales y métodos

#### 4.1. Cepas bacterianas

En este estudio se utilizaron aislamientos de *P. aeruginosa* procedentes de 9 pacientes de FQ, atendiendo a los criterios siguientes: para cada paciente se utilizó un aislado inicial y un aislado tardío de *P. aeruginosa* procedentes de su infección pulmonar crónica. Se comprobó la relación clonal de los aislados mediante la electroforesis de campo pulsado (PFGE) y la técnica de secuenciación de múltiples alelos (MLST).

La técnica MLST mide directamente los cambios en la secuencia de 7 genes de mantenimiento y caracteriza cepas mediante sus perfiles alélicos únicos.

El análisis mediante la técnica PFGE reveló la presencia de 9 clones diferentes; uno de ellos el clon FQSE-A fue detectado en 3 pacientes diferentes. Por el contrario el resto de pacientes mostró un clon exclusivo cada uno de ellos. Excepcionalmente en dos de los pacientes se aislaron dos clones (FQSE-12 y FQSE-21) exclusivos y diferentes de *P. aeruginosa*.

Por otro lado, el análisis mediante la técnica MLST, mostró la producción de 10 tipos de secuencias (ST) no del todo coincidentes con los clones identificados por PFGE. El clon FQSE-A mostró dos secuencias diferentes (ST-274 y ST-1089). La secuencia ST-1089 solo difiere de ST-274 en dos mutaciones puntuales en dos de los genes (*acsA* y *guaA*) (30). Toda la información relacionada con los aislados (código de cada paciente, fecha de los aislados y clonalidad) se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Cepas de *P. aeruginosa* utilizadas en este estudio:

<b>Aislamientos de <i>P. aeruginosa</i>*</b>	<b>Fecha de aislamiento</b>	<b>ST</b>	<b>Clones</b>
<b>FQSE10-0503</b>	05-2003	274	FQSE-A
<b>FQSE10-0111</b>	01-2011	274	FQSE-A
<b>FQSE15-0803</b>	08-2003	274	FQSE-A
<b>FQSE15-0110</b>	01-2011	1089	FQSE-A
<b>FQSE24-0304</b>	03-2004	1089	FQSE-A
<b>FQSE24-1010</b>	10-2010	1089	FQSE-A
<b>FQSE12-0603</b>	06-2003	299	FQSE-C
<b>FQSE12-1206</b>	12-2006	299	FQSE-C
<b>FQSE12-1007</b>	10-2007	146	FQSE-B
<b>FQSE12-1110</b>	11-2010	146	FQSE-B
<b>FQSE05-0403</b>	04-2003	1108	FQSE-E
<b>FQSE05-0111</b>	01-2011	1108	FQSE-E
<b>FQSE21-0419</b>	04-1999	1088	FQSE-H
<b>FQSE21-1003</b>	10-2003	1088	FQSE-H
<b>FQSE21-0505</b>	05-2005	1109	FQSE-I
<b>FQSE21-1110</b>	11-2010	1109	FQSE-I
<b>FQSE28-1006</b>	10-2006	1071	FQSE-J
<b>FQSE28-1110</b>	11-2010	1071	FQSE-J
<b>FQSE11-0603</b>	06-2003	701	FQSE-K
<b>FQSE11-1010</b>	10-2010	701	FQSE-K
<b>FQSE16-0803</b>	08-2003	1073	FQSE-M
<b>FQSE16-0910</b>	09-2010	1073	FQSE-M

*\* Nomenclatura de los aislados de P. aeruginosa: la parte marcada con la tipología negrita constituye el código con el que se representa a cada uno de los 9 pacientes con FQ utilizados en este estudio. Cada color simboliza una pareja de aislados de P. aeruginosa. El primer código alfanumérico de cada pareja, representa el aislado inicial y el segundo código, el aislado tardío.*

## **4.2. Cultivo celular**

En todo momento para llevar a cabo los experimentos con cultivos celulares se trabajó en una cabina de flujo laminar (bioseguridad nivel 2), para asegurar la esterilidad de los cultivos celulares.

Las células utilizadas pertenecen a la línea IB3-1, y se obtuvieron de una línea celular Americana (Manassas, VA), son células del epitelio bronquial de un paciente con FQ conteniendo la mutación en CFTR más común en pacientes con FQ ( $\Delta F508$ ) y una mutación sin sentido en el otro alelo (W1282), con una señal de terminación prematura (16). Las células se mantuvieron en un medio de LHC-8 (12678-017, Lifetechnologies). Las células se cultivaron en una placa 24 pocillos previamente tratada con colagenasa indispensable para la adhesión de las células IB3-1 en la placa, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y se sembraron cada 4 días cuando se acercaban a un 85% de confluencia (lo que supone aproximadamente  $5 \times 10^5$  células/pocillo).

#### **4.3. Preparación de *P. aeruginosa* para el experimento**

Los diferentes aislados de *P. aeruginosa* de pacientes con FQ se cultivaron durante 24 horas a 37°C en placas de LB. Al día siguiente, con un hisopo estéril se recogieron las bacterias y se diluyeron en medio líquido PBS, hasta conseguir una densidad óptica de 0.2 ( $\lambda=400\text{nm}$ ), lo cual supone aproximadamente  $5 \times 10^7$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) /mL. A continuación los cultivos se diluyeron 1/10 con el medio de cultivo celular LHC-8. Estas suspensiones bacterianas en medio LHC-8 se utilizaron para infectar los cultivos celulares como se explicará en el siguiente apartado.

#### **4.4. Determinación de la producción de IL-8 en células epiteliales IB3-1**

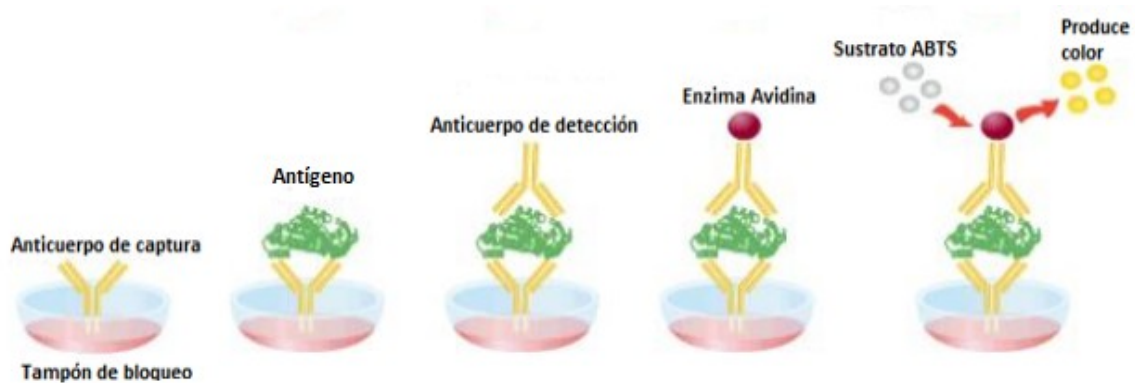
Cuando en la placa las células IB3-1 llegaron a una confluencia del 85%, se lavó 3 veces con PBS para eliminar los posibles restos de antibióticos y citoquinas previamente liberadas. Se introdujo 1 ml de la suspensión bacteriana preparada según las indicaciones del apartado anterior en cada uno de los pocillos de la placa:  $1 \times 10^6$  UFC/pocillo, lo cual supone una multiplicidad de infección (MOI) de 10 respecto al número de células. Se dejó incubar la placa durante 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 13000 g durante 5 min (a 4°C) para sedimentar las bacterias y restos de células que se podrían haber recogido. Los sobrenadantes se almacenaron en alícuotas a -80°C hasta su posterior análisis.



Para cuantificar los niveles de citoquina IL-8 presentes en el sobrenadante de las células infectadas se utilizó una ELISA tipo sándwich, ELISA Development Kit 900-K18 cot # 021018, de la casa comercial PeptoTech.

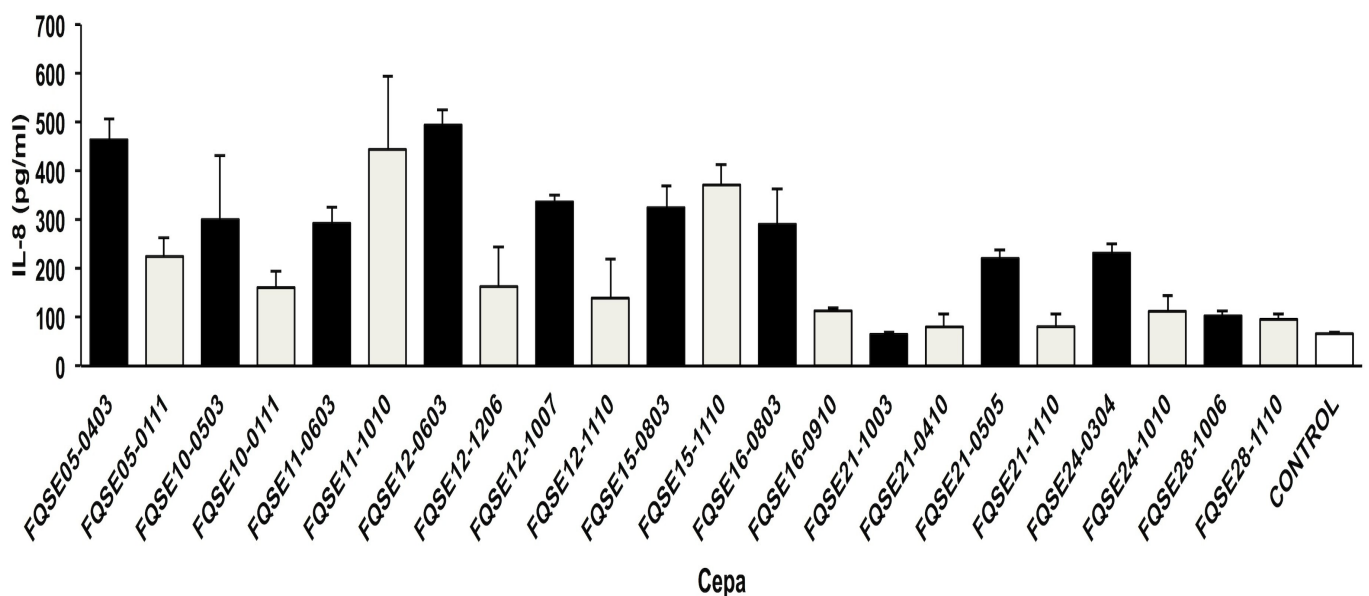
*Figura 5. ELISA tipo sándwich: Ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos.*



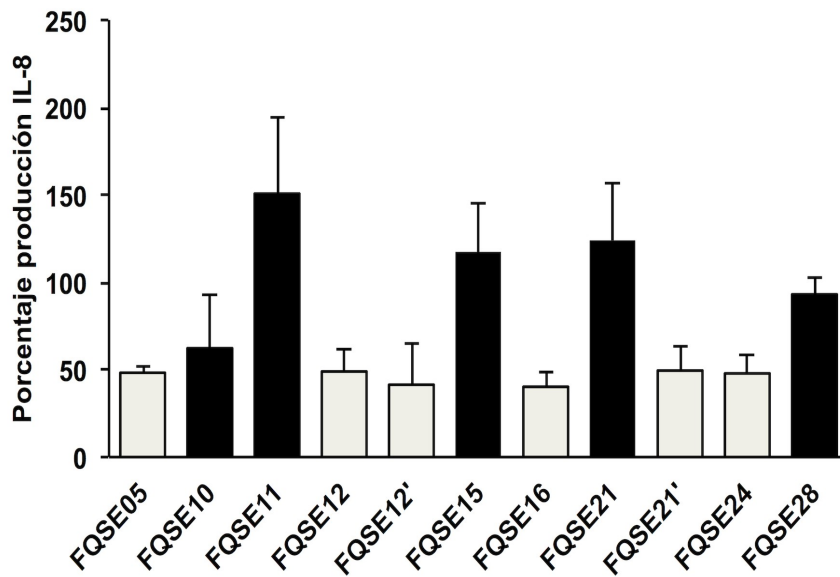
El primer lugar, se activó la placa de ELISA con un anticuerpo de captura (antígeno de conejo anti-IL-8+ 2,5 mg D-manitol). Tras 4 lavados con un tampón de lavado (0.05% Tween 20 en PBS), se añadió un tampón de bloqueo para saturar los posibles espacios libres del pocillo. A continuación se aplicó una batería de muestras y un patrón a diferentes concentraciones de 0 a 1 ng, en las que se encontraba el antígeno (IL-8). Dicho antígeno queda retenido por el anticuerpo de captura. Después de un segundo lavado para eliminar todo el material no retenido, se adicionó una solución que contenía un segundo anticuerpo, el anticuerpo de detección. Este anticuerpo se une a los antígenos que se encuentran retenidos por el primer anticuerpo. Posteriormente se adicionó la enzima Avidina peroxidasa, esta enzima se una al anticuerpo de detección. Finalmente se añadió el sustrato ABTS (Sigma Cat.# A3219) que se conjuga con la enzima Avidina produciendo una coloración característica. Se leyó la placa mediante un espectrofotómetro de microplacas a 415 nm (Model 680, Bio-Rad).

## 5. Resultados y discusión

Como puede observarse en la figura 6, en los pacientes FQSE-5, FQSE-12 (incluyendo los dos clones: FQSE-B y FQSE-C), FQSE-16, FQSE-21 (pero sólo en el caso de los aislados correspondientes al clon FQSE-I) y FQSE-24, se registró que los aislados tardíos presentaron una menor capacidad para inducir la respuesta inflamatoria, debido a que las células epiteliales IB3-1 secretaron una menor cantidad de IL-8 en comparación con los aislados iniciales. Por el contrario, en el resto de parejas de aislados no se observó una variación estadísticamente significativa en cuanto a la capacidad de inducir la producción de IL-8 por células epiteliales IB3-1. Estos resultados pueden observarse más claramente en la figura 7. En ésta se puede comprobar como en los citados pacientes (FQSE-5, FQSE-12, FQSE-16, FQSE-21 y FQSE-24) el porcentaje de producción de IL-8, al comparar aislados tardíos con respecto a iniciales, redujo aproximadamente al 50%.



**Figura 6.** Producción de IL-8 por células epiteliales IB3-1 infectadas con distintos aislados secuenciales de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con FQ. Las columnas negras y grises corresponden, respectivamente, a los aislados iniciales y tardíos de cada paciente. La columna control corresponde a la producción de IL-8 de las células sin infectar. Los resultados mostrados son la media  $\pm$  la desviación standard de tres experimentos independientes.

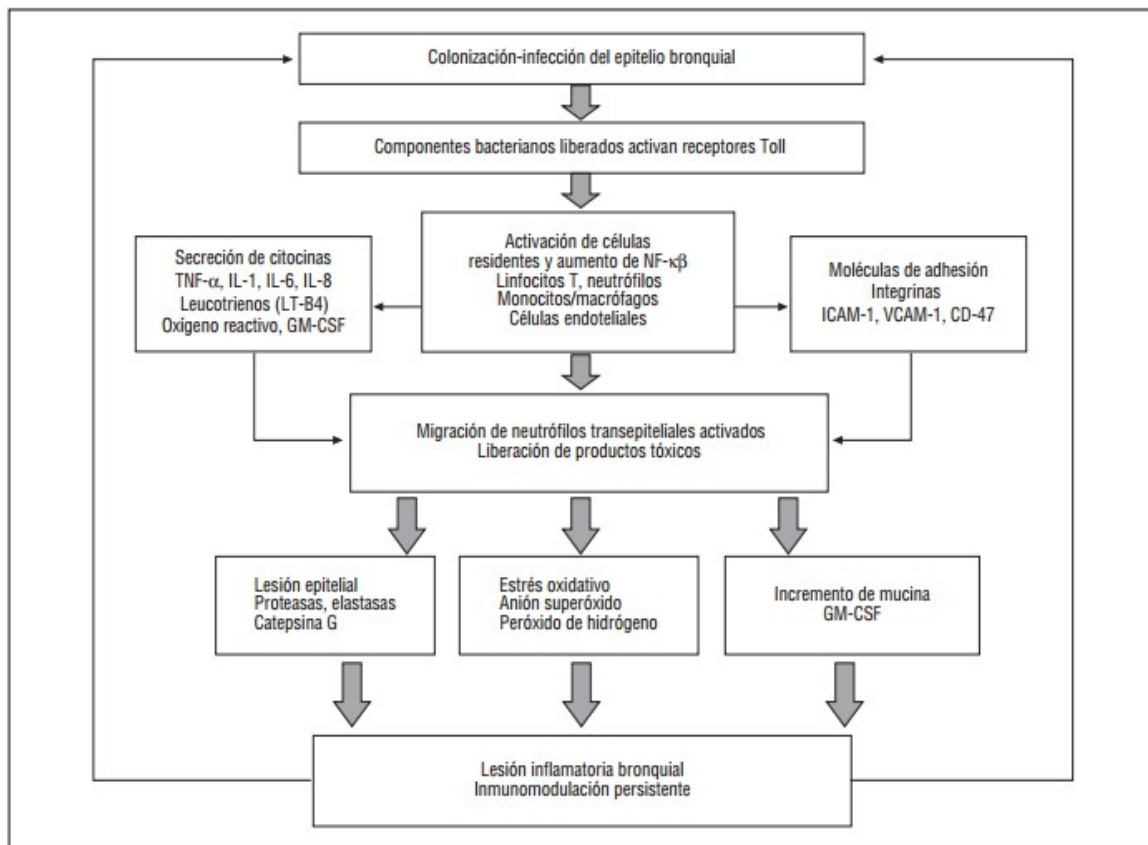


**Figura 7.** Porcentaje de la producción de IL-8 por células epiteliales IB3-1 infectadas con los aislados tardíos respecto a la producción de las células infectadas con los aislados iniciales de cada paciente. Las columnas grises corresponden a las cepas cuya diferencia de producción entre el aislado inicial y tardío es estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ , Test de Student de dos colas). Los resultados mostrados son la media  $\pm$  la desviación standard de tres experimentos independientes.

Como se ha explicado en la introducción, las personas que padecen FQ tienen drásticamente incrementada la susceptibilidad pulmonar a la infección por *P. aeruginosa* (y otros patógenos) debido a que hay una alteración en la secreción mucosa, que le confiere la capacidad de ser un ambiente ideal para la proliferación bacteriana. La enfermedad empieza con la colonización intermitente, seguida de la infección crónica donde la bacteria es muy difícil que sea erradicada. El curso de la enfermedad se caracteriza por el continuo deterioro de la función pulmonar (16, 18, 21, 22).

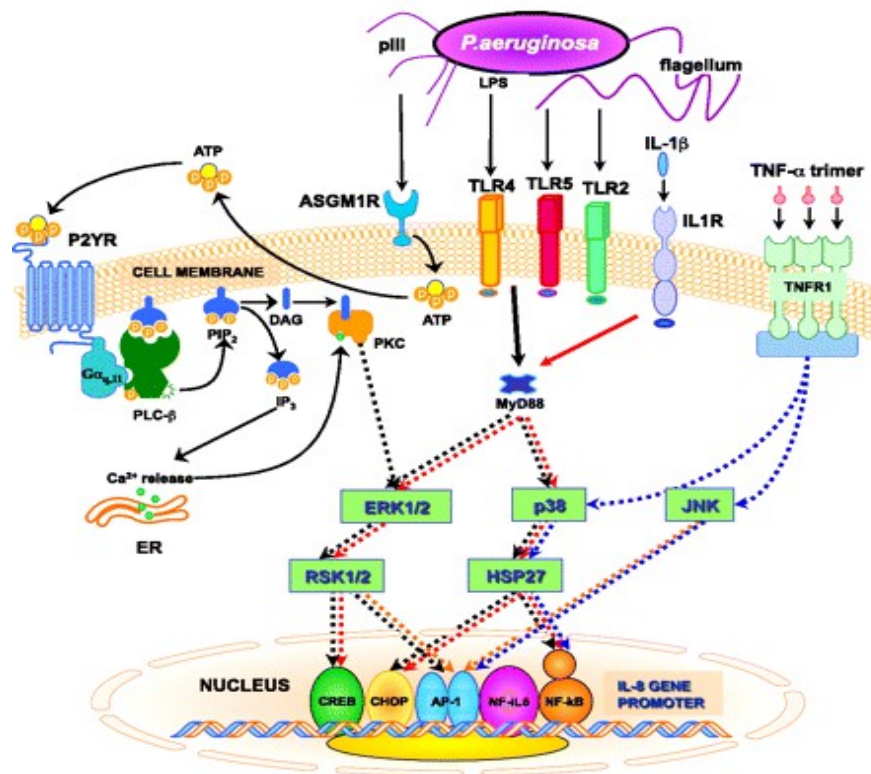
Como ya sabemos, cuando un patógeno entra en contacto a través de receptores específicos, con las células de nuestro organismo en general, y del epitelio pulmonar en particular, se produce la activación de una transducción de señal intracelular, que finalmente, mediante determinados factores de transcripción, como NF- $\kappa$ B y AP-1, resulta en la expresión de genes y liberación de factores proinflamatorios, es decir, citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, etc... Éstas provocan el reclutamiento de neutrófilos activados y múltiples componentes del sistema inmunitario, con la finalidad de controlar la infección, si bien es cierto que la masiva

inflamación combinada con la liberación de productos tóxicos por parte de los leucocitos puede acabar causando daños tisulares y una lesión bronco-pulmonar, como la que ocurre en las típicas exacerbaciones propias de la FQ (figura 8) (14). No obstante, como se sabe, la inflamación inicial y controlada es un mal necesario beneficioso para el control de las infecciones, pues permite reclutar componentes inmunitarios para acabar controlando la infección (29).



**Figura 8.** Representativa de la respuesta inflamatoria local y colonización pulmonar crónica en los pacientes con infecciones respiratorias crónicas (29).

En sentido, en este estudio se utilizó la IL-8 como marcador proinflamatorio, de entre toda la multitud que existen en nuestro sistema inmunológico. Cuando determinados antígenos de *P. aeruginosa* como el LPS, flagelos, pili, entre otros, se ponen en contacto con determinados receptores (Pattern Recognition Receptors) de las células epiteliales de pacientes con FQ, se produce una transcripción de señal que provoca la activación de determinadas proteínas quinasas que fosforilan tres MPKS que provocan la liberación de la citada IL-8 (figura 9) (33).



**figura 9.** Imagen representativa de la expresión y liberación de IL-8, producida cuando determinados antígenos de *P. aeruginosa* se unen a sus receptores (PRRs) de las células epiteliales (33).

Analizando los resultados obtenidos en los pacientes FQSE-5, FQSE-12 (en sus dos clones FQSE-B y FQSE-C), FQSE-16, FQSE-21 (sólo en su clon FQSE-I) y FQSE-24, se puede apreciar un descenso de la secreción de IL-8 por parte de las células del epitelio pulmonar, al comparar los aislados tardíos con los iniciales (figura 6). Una posible explicación a este suceso, es que durante el transcurso de la enfermedad *P. aeruginosa* puede acumular una serie de mutaciones específicas, que le provocan que pierda parte de su potencial de virulencia (pérdida de flagelo, pérdida de LPS, producción de alginato) produciendo alteraciones en su fenotipo, debido a la presión selectiva que ejerce el ambiente del hospedador. Estas mutaciones le permiten ser menos detectada por el sistema inmune innato al ser causante de una respuesta inflamatoria reducida. En un estudio publicado en el 2009, se manifestó que durante el transcurso de la FQ, la bacteria sufre una serie de mutaciones como una estrategia para ser menos detectado por el sistema inmune innato. En este estudio se utilizó como elemento inmunógeno/proinflamatorio el LPS de *P. aeruginosa*. Examinado los resultados obtenidos se confirmó que en el LPS se producen una serie de mutaciones (concretamente en

el lípido A), que provocan que sea menos inmuno-estimulador y en consecuencia cause una menor liberación de productos proinflamatorios, en comparación con la cepa parental (31). La reducción en la liberación de IL-8 por parte de los aislados tardíos citados en nuestro trabajo, estaría por tanto de acuerdo con los hallazgos explicados en este artículo.

En la pareja de aislados del paciente FQSE-10 también se observó una tendencia a la reducción de la liberación de IL-8 (figura 7). Sin embargo según el test de t-Student esta reducción no puede considerarse estadísticamente significativa, la razón de ello pueden ser causas puramente experimentales debido a posibles errores en las réplicas del experimento en esta pareja de aislados en concreto. Ello motivaría la obtención de desviaciones típicas elevadas entre réplicas, que no permitirían la aceptación estadística de la citada tendencia a la reducción de la liberación de IL-8 en el aislado tardío.

En cambio en las parejas de los aislados de los pacientes FQSE-11, FSEQ-15, FSEQ-21(sólo en el caso del clon FQSE-H) y FQSE-28 se observó una tendencia al mantenimiento o incluso al aumento de la expresión de IL-8 por células epiteliales IB3-1 (figura 6). La explicación de estos hechos habría que buscarla en la particular evolución de cada clon en el ecosistema propio del pulmón de cada paciente. Teniendo en cuenta que en el presente estudio sólo se evaluó una característica fenotípica de las parejas de aislados, no se puede descartar que otras muchas características de los aislados tardíos resultasen en mejor adaptación al pulmón crónico, con respecto a los aislados iniciales. Así, aunque estas parejas de aislados no muestren una reducción en su capacidad inflamatoria (al menos en relación a la citoquina marcadora estudiada: IL-8), no quiere decir que no están bien adaptados al pulmón de FQ, en contraposición podrían tener otro tipo de adaptaciones ampliamente descritas como por ejemplo: pérdida de flagelo para dificultar la fagocitosis, hiperproducción de alginato, mecanismos de resistencia a antibióticos y muchos más descritos en apartados anteriores (18, 21, 22).

Por otro lado, en un artículo publicado en el 2010, se estudió la liberación de otras moléculas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-6 por parte de células epiteliales al estimularlas con diferentes aislados de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con FQ. En dicho estudio se observó que las cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de la infección crónica de pacientes con FQ

tendieron a inducir una mayor respuesta inflamatoria en comparación con cepas que aún no se habían establecido crónicamente en el pulmón, es decir aislados de *P. aeruginosa* iniciales y/o intermitentes (32). En este estudio, a diferencia del nuestro no utilizaron parejas de aislados iniciales y tardíos del mismo linaje clonal y paciente, si no que utilizaron aislados intermitentes y crónicos de pacientes diferentes, sin establecer la relación clonal. Por tanto, no se puede establecer un patrón evolutivo concreto a lo largo del proceso crónico dentro de un determinado clon en cuanto a su capacidad inflamatoria, en base a los resultados de este estudio. Además, los autores tampoco utilizaron líneas de células epiteliales de pacientes con FQ (sino líneas celulares normales), lo cual podría tener cierta influencia en el patrón de secreción de las citoquinas proinflamatorias, pues no olvidemos que las células del paciente con FQ expresan determinadas mutaciones en CFTR (15). Por tanto, este artículo, si bien no es del todo comparable con el nuestro, apoya la idea de que a la larga, ciertos aislados de *P. aeruginosa* crónicos, pueden tener mayor capacidad proinflamatoria, sin que ello signifique necesariamente una peor adaptación a la infección crónica. (1)

Como se ha mencionado anteriormente, en las muestras de parejas de aislados hay tres pacientes que poseen el mismo clon de *P. aeruginosa* (FQSE-A); cabría esperar que en los tres pacientes la bacteria se comportara de la misma manera al ser el mismo clon. No obstante en los aislados tardíos de los pacientes FQSE-10 y FQSE-15 se produjo un aumento de la producción de IL-8 por células epiteliales IB3-1, mientras que en cambio, en el paciente FQSE-24 se observó una tendencia a la disminución de la expresión de la citoquina. Esto es debido a que cada paciente posee un ecosistema propio en sus vías respiratorias, y aunque las condiciones sean muy similares, un mismo clon en cada paciente puede sufrir diferentes mutaciones selectivas que le pueden conferir diferentes fenotipos de supervivencia en el pulmón (24, 25). Todo ello podría venir determinado por leves diferencias entre el pulmón de cada hospedador, así como factores externos al mismo, como diferentes tratamientos antibióticos que podrían seleccionar diferentes mutaciones (2).

## **6. Conclusiones**

Aproximadamente en la mitad de las muestras de aislados tardíos de *P. aeruginosa* se observó una reducción de la capacidad inflamatoria (en forma de IL-8) al 50%, en comparación con los aislados iniciales. No se puede decir que esta pérdida de capacidad inflamatoria sea una característica general de todas las cepas de *P. aeruginosa* durante el proceso crónico en la naturaleza (a pesar de que en la bibliografía está descrito como algo habitual). No obstante, el hecho de que una cepa no pierda capacidad inflamatoria, no implica que esté peor adaptada al pulmón de FQ.



## 7. Referencias

1. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1563-1589.
2. Kesters K, Ludwig W, Vancanneyt M, De Vos P, Gillis M, Schleifer KH. 1996. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. *Syst Appl Microbiol* 19: 465-477
3. Anzai Y, Kim H, Park JY, Wakabayashi H, Oyaizu H. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:1563-1589.
4. Saint-Onge A, Romeyer F, Lebel P, Masson L, Brousseau R. 1992. Specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 lipoprotein I gene as a DNA probe and PCR target region within the Pseudomonadaceae. *J Gen Microbiol* 138: 733-741.
5. Stead DE. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int J Syst Bacteriol* 42: 281-295.
6. Holt JG, Kreig NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9<sup>th</sup> ed, p 93-94, 151-168. The Williams & Wilkins Co, Baltimore, Md.
7. Kiska DL, Gilligan PH. 2003. *Pseudomonas*, p 719-728. En PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller y RH Tenover (eds), *Manual of Clinical Microbiology*, 8<sup>th</sup> ed. ASM Press, Washington, DC.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Maniatis AN, Karkavitsas C, Maniatis NA, Tsiftsakis E, Genimata V, Legakis NJ. 1995. *Pseudomonas aeruginosa* folliculitis due to non-O:11 serogroups: acquisition through use of contaminated synthetic sponges. *Clin Infect Dis* 21: 437-439.
  12. Maschmeyer G, Braveny I. 2000. Review of the incidence and prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19: 915-925.
  13. Lynch JP. 2001. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest* 119 (suppl 2): S373-S384.
  14. Bernardini J, Piraino B, Sorkin M. 1987. Analysis of continuous ambulatory peritoneal dialysis-related *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Am J Med* 83: 829-832.
  15. Riordan, J. R., J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J. L. Chou, et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245: 1066–1073
  16. Andersson, C., Al-Turkmani, M. R., Savaille, J. E., Alturkmani, R., Katrangi, W., Cluette-Brown, J. E., et al. (2008). Cell culture models demonstrate that CFTR dysfunction leads to defective fatty acid composition and metabolism. *Journal of Lipid Research*, 49(8), 1692-1700.
  17. Speert DP, Farmer SW, Campbell ME, et al. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to the phenotype characteristic of strains from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1990; 28:188-94.
  18. Ha UH, Wang Y, Jin S. 2003. DsbA of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for multiple virulence factors. *Infect Immun* 71: 1590-1595.
  19. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect* 2: 1051-1060.
  20. Goehring UM, Schmidt G, Pederson KJ, Aktories K, Barbieri JT. 1999. The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-

- activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* 274: 36369-36372.
21. Pedersen SS. 1992. Lung infection with alginate-producing, mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *APMIS Suppl* 28: 1-79.
  22. Folkesson A., Jelsbak L., Yang L., Johansen HK, Ciofu O., Hoiby N., Molin S. Adaptación de *Pseudomonas aeruginosa* en la fibrosis quística de la vía aérea: Una perspectiva evolutiva *Nat. Rev. Microbiol* 2012; 10 : 841-851. doi: 10.1038 / nrmicro2907
  23. Schobert M., Jahn D. anaerobia fisiología de *Pseudomonas aeruginosa* en el pulmón de la fibrosis quística. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 2010; 300 : 549-556. doi: 10.1016.
  24. Ratjen FA Fibrosis quística: Patogénesis y futuras estrategias de tratamiento *Respir. Cuidado* 2009; 54: 595-605. doi: 10.4187 / aarc0427
  25. Meluleni, G. J., M. Grout, D. J. Evans, and G. B. Pier. 1995. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoid exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J. Immunol.* 155:2029-2038.
  26. Govan JR, Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60: 539-574.
  27. Klausen M, Aaes-Jørgensen A, Molin S, et al. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol.* 2003; 50:61-8.
  28. Gilligan PH. 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 4: 35-51.
  29. Fuschillo S, De Felice A, Alzano G. Mucosal inflammation in idiopathic bronchiectasis: cellular and molecular mechanisms. *Eur Respir J.* 2008;31:396-406.
  30. Lopez-Causape, C., Rojo-Molinero, E., Mulet, X., Cabot, G., Moya, B., Figuerola, J., et al. (2013). Clonal dissemination, emergence of mutator lineages and antibiotic resistance evolution in *pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis chronic lung infection. *PloS One*, 8(8), e71001.

31. Cigana C1, Curcurù L, Leone MR, Ieranò T, Lorè NI, Bianconi I, Silipo A, Cozzolino F, Lanzetta R, Molinaro A, Bernardini ML, Bragonzi A. *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muropeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection. *PLoS One*. 2009 Dec 23;4(12):e8439.
32. Hawdon, N. A., Aval, P. S., Barnes, R. J., Gravelle, S. K., Rosengren, J., Khan, S., et al. (2010). Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected *pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 59(2), 207-220.
33. Bezzerri, V., Borgatti, M., Finotti, A., Tamanini, A., Gambari, R., & Cabrini, G. (2011). Mapping the transcriptional machinery of the IL-8 gene in human bronchial epithelial cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(11), 6069-6081.