



TESIS DOCTORAL

Respuesta inmunitaria celular y eficacia del tratamiento con células de memoria e IgM en la neumonía experimental por *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*

Tania Cebrero Canguero

Programa doctoral Biología Molecular, Biomedicina e Investigación Clínica

Departamento de Medicina

Universidad de Sevilla

Directores:

Dr. Jerónimo Pachón Díaz

Dra. M^a Eugenia Pachón Ibáñez

Tutor:

Dr. Jerónimo Pachón Díaz



Departamento de Medicina

El Dr. Jerónimo Pachón Díaz, Profesor Emérito de Medicina de la Universidad de Sevilla, como Director y Tutor de la Tesis Doctoral y la Dra. María Eugenia Pachón Ibáñez, Doctora en Biología, adscrita al Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICAN:

Que la Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título "Respuesta inmunitaria celular y eficacia del tratamiento con células de memoria e IgM en la neumonía experimental por *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*" ha sido realizada por la Licenciada Doña Tania Cebrero Canguero bajo nuestra supervisión, considerando que reúne los requisitos necesarios para su presentación.

Para que conste a los efectos oportunos, expiden la presente certificación en Sevilla, a
28 de Octubre de 2019.

Jerónimo Pachón Díaz

Director y Tutor

María Eugenia Pachón Ibáñez

Director

FINANCIACIÓN TESIS DOCTORAL

Este estudio fue financiado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0622-2012) y por el Plan Nacional de I + D + i y el Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Red Española de Investigación en Enfermedades Infecciosas (REIPI RD16/0016/0009) y cofinanciado por el Fondo Regional de Desarrollo Europeo "Una forma de alcanzar Europa" y el Programa operativo Crecimiento inteligente 2014-2020.

TCC tiene un contrato predoctoral como personal investigador en formación (PIF) del V Plan Propio de la Universidad de Sevilla. M.E.P.I. tiene una subvención "Contrato de acceso al Sistema Español de Investigación e Innovación, V Programa de Investigación de la Universidad de Sevilla" (USE13901-D).

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA FRUTO DE LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones

1. **T. Cebrero-Cangueiro**, G. Labrador-Herrera, Y. Smani, J. Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. A non-lethal *Acinetobacter baumannii* pneumonia model in immunocompetent mice to study the cellular immune response. (Enviado a *Clinical Microbiology Infection*).

Comunicaciones a congresos

1. **T. Cebrero-Cangueiro**, G. Labrador-Herrera, Y. Smani, J. Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. Cellular immune response triggered by *Acinetobacter baumannii* clinical strains in experimental pneumonia models. 11th *International Symposium on the Biology of Acinetobacter*. 20-22 Septiembre 2017; Sevilla, España.

2. **T. Cebrero Cangueiro**, G. Labrador-Herrera, Y. Smani, J. Pachon, M. Pachón-Ibáñez. Efficacy of memory CD8 T cells in an experimental murine model of pneumonia caused by a clinical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. 29th *European Congress of Clinical Microbiology and Infection disease (ECCMID)*. 13-16 Abril 2019; Ámsterdam, Países Bajos.

3. **T. Cebrero-Cangueiro**, G. Labrador-Herrera, M. Carretero-Ledesma, S. Herrera-Espejo, Y. Smani, J. Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. Eficacia del tratamiento con células de memoria en modelos experimentales murino de neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. XXI Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). 21-23 Noviembre 2019; Sevilla, España.

4. **T. Cebrero-Cangueiro**, G. Labrador-Herrera, M. Carretero-Ledesma, S. Herrera-Espejo, Y. Smani, J. Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. Eficacia del tratamiento con inmunoglobulinas enriquecidas en IgM en modelos experimentales murino de neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. XXI Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). 21-23 Noviembre 2019; Sevilla, España

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA A LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Publicaciones

1. G. Labrador-Herrera, R. Álvarez, R. López-Rojas, Y. Smani, **T. Cebrero-Cangueiro**, A. Rueda, J. Pérez-Florido, J. Pachón, and ME. Pachón-Ibáñez. Draft Genome Sequences of seven Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated from Respiratory Samples in Spain. *Genome Announcements*. 2016 Mar 31; 4 (2). pii: e00083-16. doi: 10.1128/genomeA.00083-16.
2. ME. Pachón-Ibáñez, G. Labrador-Herrera, **T. Cebrero-Cangueiro**, C. Díaz, Y. Smani, J.E. del Palacio, J. Rodríguez-Baño, A. Pascual, J. Pachón, C. Conejo. Efficacy of Colistin and Its combination with Rifampicin *in vitro* and in experimental models of infection caused by Carbapenemase-Producing Clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*. 2018 May 15; 9:912. doi: 10.3389/fmicb.2018.00912.
3. **T. Cebrero-Cangueiro**, R. Álvarez-Marín, G. Labrador-Herrera, Y. Smani, E. Cordero, J. Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. *In vitro* Activity of Pentamidine Alone and in Combination with Aminoglycosides, Tigecycline, Rifampicin, and Doripenem against clinical strains of Carbapenemase-Producing and/or Colistin-Resistant Enterobacteriaceae. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018 Oct 18; 8:363. doi: 10.3389/fcimb.2018.00363.
4. J. Xua*, ME. Pachón-Ibáñez*, **T. Cebrero-Cangueiro***, H. Chena, J. Sánchez-Céspedes, J. Zhou. Discovery of niclosamide and its O-alkylamino-tethered derivatives as potent antibacterial agents against carbapenemase-producing and/or colistin resistant *Enterobacteriaceae* isolates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2019 Jun 1; 29 (11):1399-1402. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.03.032. Epub 2019 Mar 23. * Los autores contribuyeron igualmente
5. C. Roca-Oporto*, **T. Cebrero-Cangueiro***, ML. Gil-Marqués, G. Labrador-Herrera, Y. Smani, FM. González-Roncero, LM Marín, J Pachón, ME Pachón-Ibáñez, E Cordero. Prevalence and clinical impact of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in solid organ transplant recipients. *BMC Infectious disease*. 2019 Aug 6; 19 (1):697. doi: 10.1186/s12879-019-4321-8. * Los autores contribuyeron igualmente

Comunicaciones a congresos

1. **T. Cebrero-Cangueiro**, F. Iglesias-Guerra, J. Sánchez-Céspedes, M. Vega-Holm, Y. Smani, JI. Candela-Lena, G. Labrador-Herrera, JM. Vega-Pérez, J. Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. *In vitro* activity of a library of piperazine derivatives against clinical strains of panresistant *Acinetobacter baumannii*. 10th *International Symposium on the Biology of Acinetobacter*. 3-5 Junio 2015; Atenas, Grecia.
2. **T. Cebrero-Cangueiro**, F. Iglesias-Guerra, J. Sánchez-Céspedes, M. Vega-Holm, Y. Smani, JI. Candela-Lena, G. Labrador-Herrera, JM. Vega-Pérez, J. Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. Actividad *in vitro* de una nueva librería de derivados de piperazinas contra diferentes cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a colistina. XVII Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). 19-21 Noviembre 2015; Marbella, España.
3. ME. Pachón-Ibáñez, G. Labrador-Herrera, **T. Cebrero-Cangueiro**, C. Díaz, Y. Smani, J. Pérez-del-Palacio, J. Rodríguez-Baño, A. Pascual, J. Pachón, C. Conejo. Eficacia de rifampicina, colistina y su combinación frente a cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas en un modelo de sepsis peritoneal en ratón. XVII Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). 19-21 Noviembre 2015; Marbella, España.
4. ME. Pachón-Ibáñez, G. Labrador-Herrera, **T. Cebrero-Cangueiro**, C. Díaz, Y. Smani, J. Pérez-del-Palacio, J. Rodríguez-Baño, A. Pascual, J. Pachón, C. Conejo. Eficacia de fosfomicina, amikacina, gentamicina y sus combinaciones frente a cepas clínicas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas en un modelo de sepsis peritoneal en ratón. XVII Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). 19-21 Noviembre 2015; Marbella, España.
5. ME. Pachón-Ibáñez, G. Labrador-Herrera, **T. Cebrero-Cangueiro**, C. Díaz, Y. Smani, J. Pérez-del-Palacio, J. Rodríguez-Baño, A. Pascual, J. Pachón, M. Conejo. Efficacy of colistin, alone and in combination with rifampicin, in a murine sepsis model due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. 26th *European Congress of Clinical Microbiology and Infection disease (ECCMID)*. 9-12 Abril 2016; Ámsterdam, Países Bajos.

6. M. Vega-Holm, ME. Pachón-Ibáñez, JM. Vega-Pérez, F. Iglesias-Guerra, JI. Candela-Lena, **T. Cebreiro-Cangueiro**, S. Mazzotta, Y. Smani, F. Aiello, G. Labrador-Herrera, I. Fernández-Fernández, J. Pachón, J. Sánchez-Céspedes. Synthesis of new piperazine derivatives and *in vitro* activity against clinical strains of panresistant *Acinetobacter baumannii*. 6th *EuCheMS Chemistry Congress*. 11-15 Septiembre 2016; Sevilla, España.
7. ME. Pachón-Ibáñez, C. Roca-Oporto, **T. Cebreiro-Cangueiro**, F. Molina, Y. Smani, F. González, ML. Gil-Marqués, L. Marín, J. Pachón, V. González-Galán, E. Cordero. Prevalencia e impacto clínico de la colonización nasofaríngea por *Streptococcus pneumoniae* en pacientes con trasplantes de órgano sólido. XVIII Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). 24-26 Noviembre 2016; Córdoba, España.
8. ME. Pachón-Ibáñez, C. Roca-Oporto, **T. Cebreiro-Cangueiro**, F. Molina-Ortega, Y. Smani, F. González-Roncero, ML. Gil-Marqués, L. Marín Gómez, J. Pachón, V. González Galán, E. Cordero. Prevalence and clinical impact of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in solid organ transplant recipients. 27th *European Congress of Clinical Microbiology and Infection disease (ECCMID)*. 22-25 Abril 2017; Viena, Austria.
9. **T. Cebreiro-Cangueiro**, S. Mazzotta, M. Carretero-Ledesma, F. Iglesias-Guerra, A. Jiménez-Baus, J. Sánchez Céspedes, Y. Smani, JM. Vega-Pérez, J Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. 11th *International Symposium on the Biology of Acinetobacter*. 20-22 Septiembre 2017; Sevilla, España.
10. G. Labrador-Herrera, A. Pérez-Pulido, C. Casimiro-Soriguer C, R. Álvarez-Marín, Y. Smani, **T. Cebreiro-Cangueiro**, A. Rodríguez-Villódres, J. Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. Identificación de la proteína de la membrana externa asociada a mortalidad en pacientes con *Acinetobacter baumannii*. XIX Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). 14-16 Diciembre 2017; Granada, España.
11. R. Álvarez-Marín, C. Ramírez-Trujillo, **T. Cebreiro-Cangueiro**, G. Labrador-Herrera, Y. Smani, E. Cordero, ME. Pachón-Ibáñez. Actividad *in vitro* de pentamidina sola o combinada con antimicrobianos frente a cepas clínicas de enterobacterias productoras de carbapenemasas y/o resistente a colistina. XXII Congreso nacional de la

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 24-26 Mayo 2018; Bilbao, España.

12. G. Labrador-Herrera, A. Viale, R. Álvarez-Marín, **T. Cebreiro-Cangueiro**, Y. Smani, J. Pachón, ME. Pachón-Ibáñez. Implication of the outer membrane protein CarO in the *in vitro* fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infection disease (ECCMID). 13-16 Abril 2019; Ámsterdam, Países Bajos.

13. S. Herrera-Espejo, **T. Cebreiro-Cangueiro**, G. Labrador-Herrera, M. Carretero-Ledesma, Y. Smani, J. Pachón, R. Álvarez-Marín, ME. Pachón-Ibáñez. Evaluación *in vitro* de la actividad de pentamidina asociada a otros antimicrobianos en el tratamiento de *Pseudomonas aeruginosa*. XXI Congreso de la Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas (SAEI). 21-23 Noviembre 2019; Sevilla, España

Patente

1. J Sánchez-Céspedes, M.E. Pachón-Ibáñez, J. Pachón, P. Martínez-Aguado, **T. Cebreiro-Cangueiro**, JM. Vega-Pérez, F. Iglesias-Guerra, M. Vega-Holm, JI. Candela-Lena, S. Mazzotta. Piperazine derivatives as antiviral agents with increased therapeutic activity. PCT/EP2017/054252.

Índice

ABREVIATURAS	17
RESUMEN	¡Error! Marcador no definido.
INTRODUCCIÓN	21
1. Bacilos Gram-negativos no fermentadores: Epidemiología, resistencias antimicrobianas, factores de virulencia y patogénesis.....	23
1.1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	24
1.1.1. Epidemiología	24
1.1.2. Resistencias antimicrobianas.....	25
1.1.3. Factores de virulencia y patogenicidad	26
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
1.2.1. Epidemiología	26
1.2.2. Resistencia antimicrobiana.....	27
1.2.3. Factores de virulencia y patogenicidad	28
2. Alternativas de tratamiento para bacilos Gram-negativos no fermentadores.....	29
2.1. Alternativas antibióticas	29
2.1.1. Combinaciones de antibióticos.....	30
2.1.2. Nuevos antibióticos	31
2.2. Alternativas no antibióticas.....	32
2.2.1. Péptidos antimicrobianos	32
2.2.2. Fagoterapia	33
2.2.3. Adyuvantes.....	34
2.2.4. Inhibición de factores de virulencia	34
2.2.5. Inmunoterapia.....	35
3. Respuesta inmune en infecciones bacterianas	36
3.1. Respuesta Inmune Innata	37
3.1.1. Respuesta inmune innata frente a infecciones causadas por <i>A. baumannii</i> ..	38
3.1.2. Respuesta inmune innata frente a infecciones causadas por <i>P. aeruginosa</i> ..	39
3.2. Respuesta Inmune Adaptativa.....	40
3.2.1. Respuesta inmune adaptativa frente a infecciones causadas por <i>A. baumannii</i>	42
3.2.2. Respuesta inmune adaptativa frente a infecciones causadas por <i>P.aeruginosa</i>	43
4. Inmunoterapia en infecciones bacterianas	44
4.1. Inmunoterapia adoptiva con células de memoria	45

Índice

4.2. Inmunoterapia pasiva con inmunoglobulinas	46
FUNDAMENTOS	49
HIPÓTESIS	53
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. Cepas bacterianas	63
2. Animales de experimentación	63
3. Estudios <i>in vitro</i>	63
3.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	63
3.2. Concentración Mínima Bactericida (CMB)	64
4. Caracterización de modelos murinos no letales de neumonía.....	65
4.1. Preparación del inóculo bacteriano.....	65
4.2. Anestesia e inoculación	65
4.3. Estudios de supervivencia.....	66
4.4. Estudios histopatológicos	67
5. Estudios de la respuesta celular innata y adaptativa en los modelos no letales de neumonía causada por cepas de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> , con diferente patrón de resistencia a colistina	67
6. Citometría de flujo.....	69
7. Estudios de la respuesta inmune innata y adaptativa provocada por la mucina porcina	69
7.1. Cuantificación de los niveles de Interleuquina 22 (IL-22) en tejido pulmonar.....	69
7.2. Estudios histopatológicos	70
7.3. Curvas de crecimiento	71
8. Estudios de eficacia de las células de memoria en modelos letales experimentales de neumonía causada por cepas de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> , con diferentes patrones de resistencia a colistina.....	72
8.1. Caracterización de los modelos murinos letales de neumonía.....	72
8.2. Aislamiento de linfocitos CD8+ y CD19+ de memoria	72
8.3. Evaluación de la eficacia del tratamiento con linfocitos CD8+ de memoria en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de <i>A. baumannii</i> , con diferente patrón de resistencia a colistina.....	73
8.3.1. Grupos de animales de experimentación.....	73
8.3.2. Grupos de toxicidad	74
8.3.3. Grupos para estudios histopatológicos	74

Índice

8.3.4. Evaluación del efecto del tratamiento:	75
8.4. Evaluación de la eficacia del tratamiento con linfocitos CD19+ de memoria en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de <i>P. aeruginosa</i> , con diferente patrón de resistencia a colistina	75
8.4.1. Grupos de animales de experimentación.....	75
9. Evaluación de la eficacia del tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas en IgM en monoterapia y en combinación con antimicrobianos en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de <i>P. aeruginosa</i> , con diferente patrón de resistencia a colistina	76
9.1.1 Grupos de animales de experimentación	76
10. Análisis estadísticos.....	77
RESULTADOS	79
CAPÍTULO 1: Respuesta inmune celular frente a modelos no letales de neumonía experimental causada por multirresistentes de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i>, con diferente patrón de resistencia a colistina.....	81
1. Estudios <i>in vitro</i>	81
1.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	81
2. Caracterización de modelos murinos no letales de neumonía.....	83
2.1. Neumonía murina no letal causada por cepas de <i>A. baumannii</i> con diferente patrón de resistencia a colistina	83
2.2. Neumonía murina no letal causada por cepas de <i>P. aeruginosa</i> con diferente patrón de resistencia a colistina.	83
3. Respuesta celular innata y adaptativa en los modelos no letales causada por cepas de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> , con diferente patrón de resistencia a colistina	86
3.1 Respuesta celular innata frente a cepas de <i>A. baumannii</i> con diferentes patrones de resistencia a colistina	86
3.2. Respuesta celular adaptativa frente a cepas de <i>A. baumannii</i> con diferente patrón de resistencia a colistina.	89
3.4. Respuesta celular adaptativa frente a cepas de <i>P. aeruginosa</i> con diferente patrón de resistencia a colistina	97
4. Respuesta inmune innata y adaptativa provocada por la mucina porcina.....	101
4.1. Respuesta celular innata provocada por la mucina porcina	101
4.2. Respuesta celular adaptativa provocada por la mucina porcina	106
4.3. Niveles de Interleuquina 22 (IL-22) en tejido pulmonar	111
4.4. Estudios histopatológicos	112
4.5. Curvas de crecimiento	113

Índice

CAPÍTULO 2: Eficacia de las células de memoria en modelos letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> ..	115
1. Evaluación de la eficacia del tratamiento con linfocitos T CD8+ de memoria en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de <i>A. baumannii</i> con diferente patrón de resistencia a colistina.....	115
2. Evaluación de la eficacia del tratamiento con linfocitos B (CD19+) de memoria en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de <i>P. aeruginosa</i> con diferente patrón de resistencia a colistina.....	116
CAPÍTULO 3: Eficacia de la inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas en IgM en modelos letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de <i>P. aeruginosa</i> ..	119
1. Evaluación de los tratamientos con inmunoglobulinas enriquecidas en IgM en monoterapia y en combinación con antimicrobianos en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de <i>P. aeruginosa</i> , con diferente patrón de resistencia a colistina.	119
DISCUSIÓN	123
CAPÍTULO 1: Respuesta inmune celular frente a modelos no letales de neumonía experimental causada por multirresistentes de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> , con diferente patrón de resistencia a colistina.....	125
CAPÍTULO 2: Eficacia de las células de memoria en modelos letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i> ..	131
CAPÍTULO 3: Eficacia de la inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas en IgM en modelos letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de <i>P. aeruginosa</i> ..	134
CONCLUSIONES	137
REFERENCIAS	145

Abreviaturas

ABREVIATURAS

- AbOmpA: Proteína de la membrana externa
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMP: Péptidos Antimicrobianos
- BALT: Tejidos linfoides asociados a bronquios
- BCR: Receptores de linfocitos B
- BGN: Bacilos Gram-negativos
- CAZ: Ceftazidima
- CC: Control de crecimiento
- CD: Células Dendríticas
- CE: Control de esterilidad
- CEEA: Comité Ético de Experimentación Animal
- CFTR: Regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística
- Cif: Factor Inhibidor del transportador CFTR
- CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*
- CMB: Concentración Mínima Bactericida
- CMI: Concentración Mínima Inhibitoria
- CMS: Colistin metato sódico
- CO₂: Dióxido de Carbono
- CPA: Células Presentadoras de Antígenos
- CR3: Receptor 3 del complemento de macrófagos
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DML: Dosis Mínima Letal
- eADN: Ácido desoxirribonucleico extracelular
- EARS-Net: Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos
- ECDC: Centro Europeo para la prevención y control de enfermedades
- ELISA: *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*

Abreviaturas

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

i.m.: intramuscular

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenosa

IFN: Interferon

Ig: Inmunoglobulina

IgIV (IgM): Inmunoglobulina intravenosa enriquecida en IgM

IgIV: Inmunoglobulina intravenosa

LPC: Lisofosfatidilcolina

LPS: Lipopolisacárido

Mg⁺: Magnesio

MHB: *Mueller-Hinton Broth*

MHBII: Mueller-Hinton Broth II (cationes ajustados)

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MoAb: Anticuerpos monoclonales

MR: Multirresistentes

NaN₃: Azida de Sodio

NET: Trampa extracelular de neutrófilos

NH₄Cl: Cloruro de amonio

NK: Células *Natural Killer*

NLR: Receptores tipo NOD

NucAb: Nucleasa de la membrana externa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMVs: Vesículas de la membrana externa

PAMP: *Pathogen Associated Molecular Patterns*

Abreviaturas

PBS: *Phosphate buffered saline*

PMN: Polimorfos nucleares

PRIOAM: Programa Institucional para la Optimización del Tratamiento Antimicrobiano

PRR: *Pattern Recognition Receptor*

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

Rpm: Revoluciones por minuto

s.c.: subcutánea

SB: Sulbactam

SD: Sin diluir

SFB: Suero Fetal Bovino

SPF: *Specific Pathogen Free*

T3SS: Sistema de secreción tipo 3

TCR: Receptor de linfocitos T

TGC: Tigeciclina

TLR: Receptores tipo toll

UCIs: Unidad de Cuidados Intensivos

UFC: Unidades formadoras de colonia

INTRODUCCIÓN

Introducción

1. Bacilos Gram-negativos no fermentadores: Epidemiología, resistencias antimicrobianas, factores de virulencia y patogénesis

Las resistencias bacterianas a los antibióticos son un problema de salud pública mundial, encontrándonos en ocasiones con bacterias multirresistentes (MR) o extremadamente resistentes, que dificultan el tratamiento, causando hospitalizaciones prolongadas, aumentando los costes derivados de su atención y la morbi-mortalidad asociada a este tipo de infecciones. Asimismo, diariamente se describen nuevos mecanismos de resistencias que ponen en peligro la capacidad para tratar infecciones comunes, como son la neumonía, la septicemia, enfermedades de transmisión alimentaria, etc. (1, 2). *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* son bacilos Gram-negativos (BGN) no fermentadores, y paradigmas de las resistencias microbianas, encontrándose dentro del grupo de microorganismos denominados ESKAPE por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, y especies de *Enterobacter*) (3, 4). Además, las infecciones causadas por *A. baumannii* y *P.aeruginosa* están dentro de los patógenos aislados que causan más infecciones en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) (5, 6) cómo son neumonías asociadas a ventilación mecánica, sepsis, bacteriemia, infecciones tras un procedimiento quirúrgico o infecciones del tracto urinario (7). Así, en 2013 se produjeron 4,2 millones de infecciones por BGN nosocomiales en la Unión Europea (8), lo que provocó alrededor de 175.000 muertes (9). En 2017, la OMS publicó una lista de los patógenos para los cuales es urgente la búsqueda de nuevos antibióticos, estando incluidos en ésta cómo prioridad crítica *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (10). Esta alerta ha provocado que los gobiernos a nivel mundial hayan comenzado políticas frente a las resistencias microbianas, cómo en EE.UU. (www.cdc.gov), Gran Bretaña (www.gov.uk/dh), o España (www.aemps.gob.es), entre otros. Estas nuevas políticas, están permitiendo buscar alternativas tanto con aproximaciones antimicrobianas cómo no antimicrobianas (11, 12). Además, es importante informar y educar a la sociedad y al personal sanitario, con la finalidad de disminuir la propagación y el desarrollo de resistencias microbianas, mediante programas de limpieza en hospitales y mediante estudios de optimización de antimicrobianos (1). El Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, España, inició el programa institucional para la optimización del tratamiento antimicrobiano (PRIOAM) en 2011, con el objetivo de enseñar, capacitar y promover el conocimiento

Introducción

del uso adecuado de los antimicrobianos con la finalidad de reducir la morbi-mortalidad en pacientes con infecciones causadas por este tipo de patógenos y evitar el desarrollo de resistencia (13).

1.1. *Acinetobacter baumannii*

1.1.1. Epidemiología

Acinetobacter spp. son BGN, aeróbicos estrictos, no fermentadores, oxidasa positiva y negativa, catalasa positiva, oportunistas, con un ADN que contiene un porcentaje del 39 al 47% de G+C (14). Otra característica importante de esta especie es la habilidad de colonizar cualquier tipo de superficie (15), ya que puede ser encontrada en suelo, en agua, en animales y en humanos (16). Siendo además, una de las especies más comunes causantes de infecciones nosocomiales (17). Igualmente, fue uno de los microorganismos que más se aislaron (3,6%) en un estudio realizado por el Centro europeo para la prevención y control de enfermedades (ECDC), sobre las prevalencias de las infecciones nosocomiales y el uso de antimicrobianos en UCI entre 2011-2012 (8). Otro estudio demostró que aproximadamente el 9% de las infecciones producidas en pacientes críticos en UCI de todo el mundo son producidas por *A. baumannii* (18, 19), dicha frecuencia continuará aumentando gradualmente (18).

A. baumannii, causa infecciones graves entre las que se encuentran la neumonía asociada a ventilación mecánica, bacteriemia, infecciones de la piel y tejidos blandos, infecciones tras una cirugía, infecciones del tracto urinario, sepsis, meningitis y endocarditis (17, 20, 21). La mortalidad asociada a este patógeno oscila entre 7,8 y 43%, siendo esta tasa mayor en pacientes ingresados en UCI (10-43%) comparado con los ingresados en plantas hospitalarias (7,8-23%) (18), siendo la tasa de mortalidad asociada a la neumonía nosocomial de entre un 30-75% (22).

Introducción

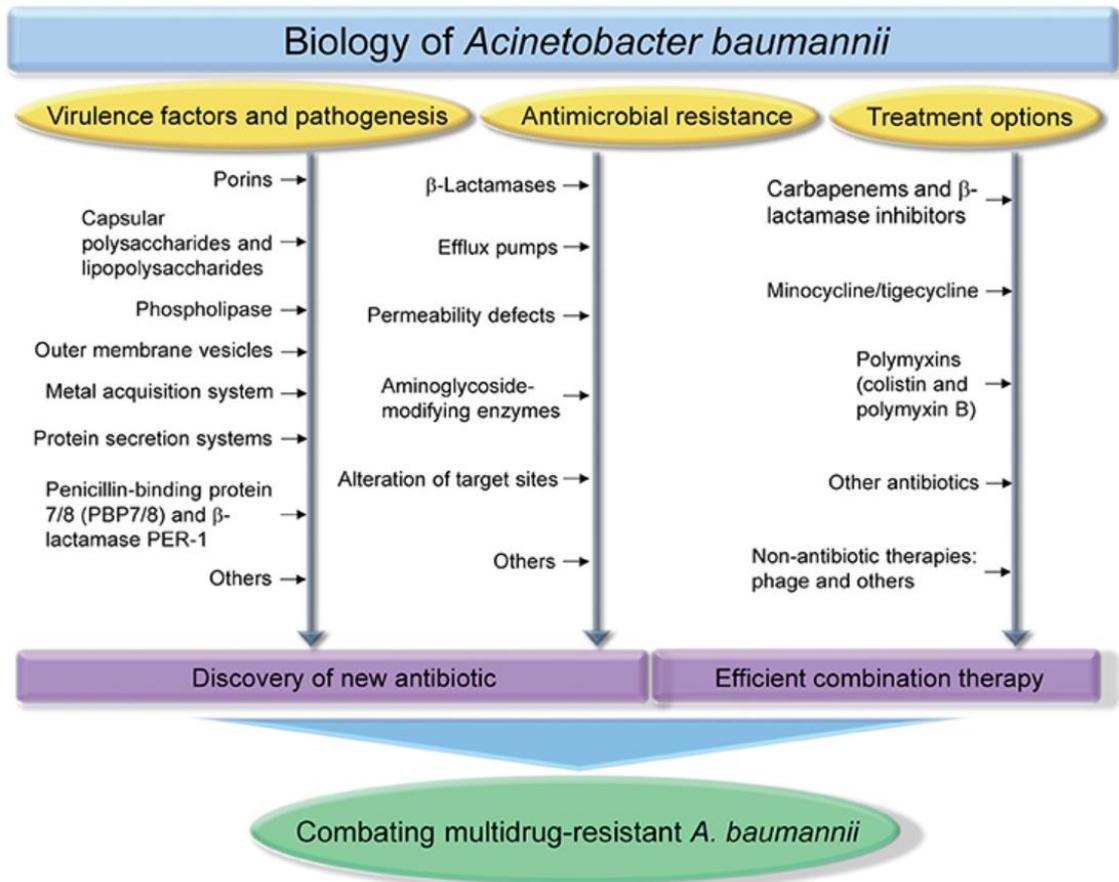


Figura 1. Biología de *Acinetobacter baumannii* (23).

1.1.2. Resistencias antimicrobianas

En los últimos años, ha aumentado el porcentaje de aislados de *A. baumannii* resistentes a agentes antimicrobianos, esto supone un problema para la salud pública, reduciéndose las alternativas de tratamiento frente a infecciones causadas por este patógeno. Algunos países europeos informan de valores con la mitad de aislados de *A. baumannii* resistentes a la mayoría de las familias de antimicrobianos activos (carbapenémicos, fluoroquinolonas y/o aminoglucósidos), frente a este patógeno siendo este porcentaje de resistencia mayor en el sur de Europa (8). Diversos estudios, han demostrado la capacidad de *A. baumannii* de desarrollar rápidamente resistencias (24). Actualmente, existen un gran número de mecanismos de resistencias descritos como: β-lactamasas, degradación enzimática de antimicrobianos, modificación de la diana terapéutica, actividad intrínseca de bombas de flujo que exportan antibióticos y defectos en la permeabilidad de la membrana (18, 25, 26). En ocasiones, algunas cepas presentan más de un mecanismo de resistencia, debido a combinación de mutaciones de genes

Introducción

endógenos, adquisición de material genético extraño y alto nivel de plasticidad genómica, lo que dificultan aún más el tratamiento de estas infecciones (23).

1.1.3. Factores de virulencia y patogenicidad

La virulencia de *A. baumannii* parece ser impulsada inicialmente por su capacidad para evadir el sistema del complemento y la fagocitosis (14). Existen diversos estudios que demuestran el alto nivel de virulencia de este patógeno, en comparación con otros BGN de su misma especie (27-29). Además, aunque se han descrito diversos factores de virulencia responsables de su patogenicidad, aún se sabe muy poco sobre este patógeno en comparación con otros BGN (24). Estudios genómicos, transcriptómicos y proteómicos en *A. baumannii* y estudios en modelos experimentales de infección, permitirán ampliar el conocimiento en este área así como encontrar nuevos factores de virulencia. Entre los factores de virulencia conocidos se encuentran: lipopolisacáridos (LPS), polisacáridos capsulares, proteínas de la membrana externa (Ab OmpA), vesículas de la membrana externa (OMVs), fosfolipasa D, biofilm, proteínas de unión a penicilina, el sistema de secreción de proteínas y el sistema de adquisición de hierro mediado por Acinetobactin (23, 30). El continuo aumento de las tasas de resistencia, junto a la escasez de tratamientos óptimos frente a estos, hace necesaria la identificación de nuevos factores de virulencia que ayuden a caracterizar la patogénesis y determinar nuevas dianas terapéuticas para combatir infecciones causadas por este patógeno.

1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

1.2.1 Epidemiología

P. aeruginosa es un BGN, aerobio facultativo, oxidasa positiva y no fermentador de lactosa (31). Este patógeno necesita requisitos nutricionales mínimos para su crecimiento y utiliza una amplia variedad de fuentes ambientales (31). Además, puede crecer anaeróbicamente y no realiza fermentación, obteniendo energía de la oxidación de los azúcares. La combinación de su mínimo requisito nutricional junto a la alta resistencia intrínseca que tiene a los antibióticos, le permite sobrevivir en una amplia gama de entornos naturales y artificiales, entre los que se encuentran las superficies hospitalarias (32). Otro estudio demostró que aproximadamente el 20% de las infecciones producidas en pacientes críticos en UCI son producidas por *P. aeruginosa* (18). El estudio realizado por el ECDC entre 2011 y 2012, demostró que casi un 9% de

Introducción

las infecciones nosocomiales seran causadas por *P. aeruginosa* (8). Es además, el cuarto patógeno más aislado en Europa, la segunda causa de neumonías y la tercera causa más común de bacteriemia (8, 33). Igualmente, es uno de los patógenos nosocomiales más aislados en EE.UU (34). *P. aeruginosa* causa entre otras, neumonías, infección del tracto urinario, infecciones de piel y partes blandas, infecciones oculares, bacteriemias, septicemia y endocarditis (35), con una mortalidad asociada del 70% (36).

1.2.2. Resistencia antimicrobiana

P. aeruginosa es un patógeno causante de infecciones nosocomiales por cepas resistentes (37) y causante de gran variedad de infecciones en UCI (6). La alta resistencia intrínseca que tiene a los antibióticos, se debe a la baja permeabilidad de su membrana externa, a la expresión constitutiva de las bombas de flujo que expulsan al antibiótico y a la producción de enzimas como β -lactamasas AmpC (31). También, se ha observado que al someterse a presión selectiva de antibióticos, la respuesta inducida facilita la supervivencia bacteriana y la capacidad de desarrollar resistencias (38), lo que se denominan resistencias adaptativas. Por lo tanto, otro factor asociado al aumento de resistencias es el uso frecuente de agentes antimicrobianos (38). Además, *P. aeruginosa* tiene la capacidad de tener resistencias adquiridas debidas a la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal o mutaciones en genes que codifican porinas, bombas de flujo, proteínas de unión a penicilina y β -lactamasas cromosómicas (39, 40). A menudo, existen resistencias combinadas a muchos antibióticos (31), limitándose las alternativas de tratamiento. Datos proporcionados por la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos (EARS-Net) en 2015, mostraron que un 13% de aislados de *P. aeruginosa* eran resistentes a aminoglucósidos y ceftazidima; y un 20% a fluoroquinolonas, piperacilina/tazobactam y carbapenems (41). En resumen, las infecciones causadas por cepas de *P. aeruginosa* MR son difíciles de tratar e incluyen desafíos entre diagnóstico y tratamiento, con altos costes y mayor morbi-mortalidad (4).

Introducción

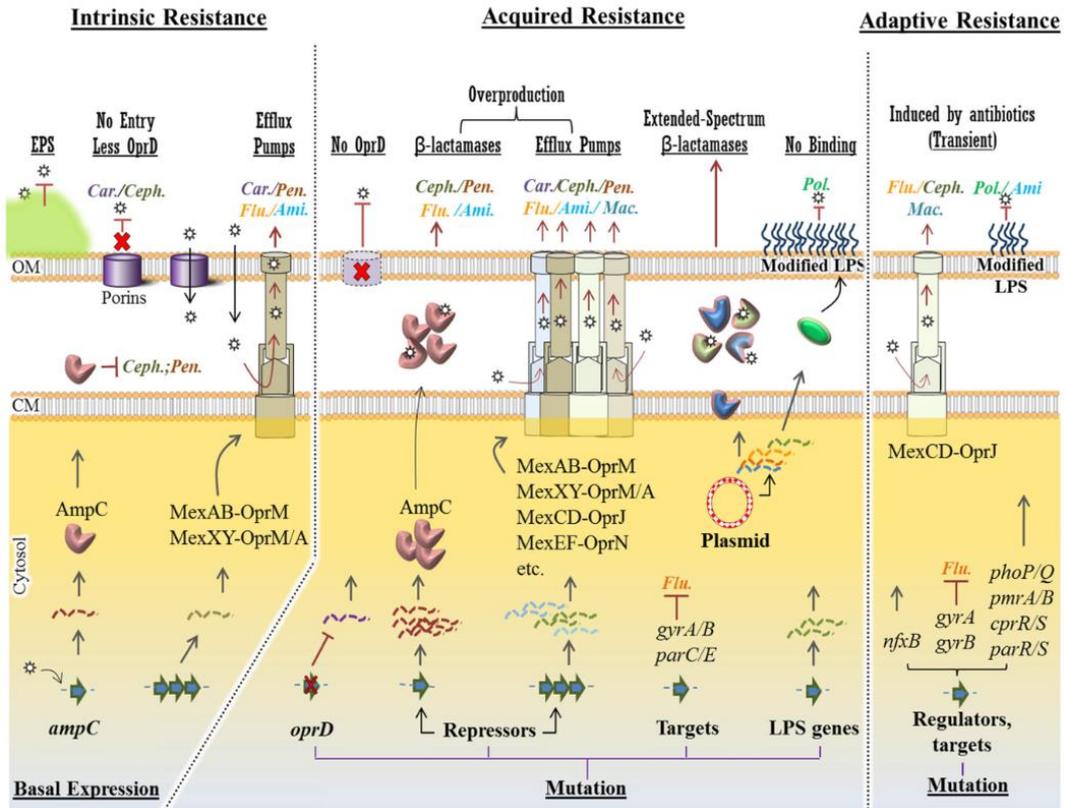


Figura 2. Mecanismos intrínsecos, adquiridos y adaptativos que confieren resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa* (42).

1.2.3. Factores de virulencia y patogenicidad

P. aeruginosa utiliza una gran cantidad de factores de virulencia para colonizar e infectar las células del huésped, muchos de los cuales están regulados mediante el *quórum sensing* (43). Estos factores de virulencia se definen generalmente como moléculas derivadas de patógenos que ayudan a iniciar o empeorar una infección (43). *P. aeruginosa*, es un patógeno oportunista, causante principalmente de infecciones pulmonares agudas o crónicas (32). Existen estudios que han demostrado que el fenotipo difiere entre cepas aisladas de infecciones agudas o de infecciones crónicas (44). Se ha encontrado que los aislados de infecciones agudas expresan gran cantidad de factores de virulencia, mientras que los aislados de infecciones crónicas carecen de algunos de ellos, como los flagelos y los pili, además de regular otros mecanismos de virulencia como el sistema de secreción tipo 3 (T3SS) (45) y formar más fácilmente biofilm (46, 47). Entre los factores de virulencia descritos en *P. aeruginosa* están: porinas, flagelos y pili tipo 4, T3SS, *quorum sensing*, formación de biofilm, proteasas, polisacáridos capsulares y LPS.

2. Alternativas de tratamiento para bacilos Gram-negativos no fermentadores

En una infección, la elección de un tratamiento adecuado óptimo en las primeras horas es de extrema importancia para la buena evolución de la enfermedad, sin embargo es a veces cada vez más difícil de lograr entre otros motivos por el aumento de resistencias (14). *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, causan infecciones graves en pacientes inmunodeprimidos (31, 48), con tasas de mortalidad de entre 20-50% y del 70%, respectivamente (24, 36), siendo responsables de más del 10% de las infecciones en UCI (8, 19). El aumento de cepas resistentes se asocia a hospitalizaciones prolongadas, altos costes y aumentos en la mortalidad (1). Todas estas razones hacen urgente la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento y el control de las infecciones causadas por estos patógenos (49-51).

2.1. Alternativas antibióticas

En la práctica clínica, la eficacia de los antibióticos tradicionales se está disminuyendo debido a la capacidad de los patógenos para desarrollar y diseminar mecanismos de resistencia contra estos y, frente a los antibióticos considerados como de "último recurso". Por este motivo, en los últimos años se han recuperado antibióticos antiguos y olvidados, y se han iniciado estudios de optimización de antimicrobianos mediante estudios farmacocinéticos, implementándose nuevas estrategias de dosificación que mejoren su eficacia (52).

Para cepas de *A. baumannii* los antibióticos de tipo β -lactámicos son la mejor alternativa, sin embargo, las carbapenemas se están convirtiendo en una opción terapéutica cada vez más crítica debido al aumento de la resistencia. El mejor predictor de eficacia de estos es el tiempo en que las concentraciones séricas permanecen por encima de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (14). Para cepas de *P. aeruginosa* no existe un acuerdo de un tratamiento antimicrobiano óptimo, debido a su amplia gama de mecanismos de resistencia intrínsecos y adaptativos (53). A pesar de ello, antibióticos de la clase de betalactámicos, quinolonas y aminoglucósidos podrían ser activos frente a este tipo de cepas (31). Dentro de las últimas opciones terapéuticas que se utilizan para el tratamiento de infecciones por cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* MR es la colistina (polimixina E), aunque con riesgo de nefrotoxicidad y neurotoxicidad (54-56).

Introducción

<i>Drug class</i>	<i>Characteristics</i>	<i>Resistance and limitations</i>
β-Lactams (1) Penicillins, aminopenicillins, early-generation cephalosporins (2) β-Lactam/β-lactamase inhibitor combinations (3) Extended-spectrum cephalosporins (4) Carbapenems	In the absence of resistance, these agents are effective against a broad array of bacteria. Remain active against gram-negative bacteria that produce less potent β-lactamases. Broad-spectrum β-lactam agents.	Because resistance is now widespread, not recommended for serious gram-negative infections. Resistance is increasing. Bacteria resistant to extended-spectrum cephalosporins and carbapenems are usually resistant to these agents as well. Newer β-lactamase inhibitors may overcome some resistance, even with CRE. When resistance develops, carbapenems are the only remaining β-lactams likely to be effective. Carbapenem resistance may be found among many gram-negative bacteria. Once resistant to this class, bacteria are usually resistant to all β-lactams.
Fluoroquinolones	Orally administered, so frequently used in both outpatients and inpatients.	Resistant bacteria develop rapidly with increased usage. Hypervirulent strains of <i>C. difficile</i> are also associated with increased usage.
Aminoglycosides	Often combined with β-lactam agents.	Growing resistance. Not commonly used as monotherapy due to renal toxicity.
Tetracyclines and glycyclines (i.e., tigecycline)	Tetracyclines are not first-line options for serious infections, but can be considered for organisms resistant to other drug classes. Glycyclines can be considered for MDR gram-negative infections.	Because tigecycline rapidly distributes out of bloodstream, it is not suitable as monotherapy for BSIs. Rare reports of resistance to tigecycline have appeared.
Polymyxins	Used as a last option.	Significant toxicity (nephrotoxicity). Reports of resistance are emerging.

Adapted from Centers for Disease Control and Prevention.²⁵

BSIs, bloodstream infections; CRE, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; MDR, multidrug resistant.

Figura 3. Implicaciones de la aparición de resistencia y otras limitaciones de las clases de antimicrobianos de uso común para tratar infecciones debidas a BGN (57).

Sin embargo la presión antibiótica de colistina, a veces por ser el último antibiótico activo frente a estas cepas, ha generado la aparición de cepas resistentes a colistina. Los mecanismos de resistencia descritos son modificaciones en la diana principal del antibiótico, el lípido A, o la eliminación de la misma. Recientemente, se han identificado plásmidos con altos potenciales de transferencia entre bacterias, los cuales contiene una enzima fosfoetanolamina transferasa confiriendo resistencia a colistina como el gen *mcr* y sus variantes (58-61).

2.1.2. Combinaciones de antibióticos

Dadas las limitaciones del tratamiento en monoterapia con antimicrobianos para el tratamiento de infecciones causadas por cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* MR, se empezaron a usar tratamientos combinados. Con ello, se pretende ampliar la cobertura empírica proporcionada por dos agentes antimicrobianos con diferentes espectros de actividad; conseguir una sinergia entre antibióticos y prevenir o retrasar la aparición de

Introducción

resistencia durante la terapia antimicrobiana (62, 63). Esta opción está recomendada para la sepsis grave, el shock séptico y la neumonía causada por BGN (62, 64).

La colistina, se usa comúnmente en combinación aumentando la permeabilidad de otros antibióticos a través de la membrana externa bacteriana al actuar de detergente (65). Por ejemplo, la combinación de rifampicina a colistina y meropenem o doripenem, tiene actividad sinérgica *in vitro* frente a cepas de *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y Enterobacterias productoras de carbapenemasas (66-68). Además, existen estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que demuestran la eficacia de la terapia combinada frente a infecciones por *A. baumannii* MR (69, 70). Por ejemplo, se demostró que la combinación de colistina con tigeciclina (71), imipenem o rifampicina (72, 73), eran eficaces en el tratamiento de este tipo de cepas. Igualmente, la combinación de betalactámicos a aminoglucósidos, resultaron eficaces frente a cepas de *P. aeruginosa* MR provenientes de pacientes con fibrosis quística (74), ya que ambos antibióticos tienen diferentes dianas y modos de entrada en la bacteria. De la misma manera, se han demostrado la eficacia de combinaciones triples de antibióticos por ejemplo de aminoglucósido, betalactámico, colistina, fluoroquinolona, macrólido o rifampicina (67, 71).

Aunque se han descrito anteriormente las ventajas asociadas al uso combinado de antimicrobianos, existen diversos estudios que evidencian riesgos a una mayor toxicidad, selección de cepas resistentes y sobreinfección (75).

2.1.3. Nuevos antibióticos

Debido a la escases de antibióticos activos y al aumento de resistencias microbianas, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) adoptaron medidas que facilitasen el desarrollo y aprobación de nuevos antibióticos eficaces, como patrocinar el desarrollo de nuevos antibióticos, reducir el número de pacientes requeridos en un ensayo y extender la duración de la exclusividad (52). Por este motivo son muchos los nuevos agentes que han sido aprobados recientemente o que están en desarrollo clínico, algunos de los cuales parecen activos frente a BGN MR (76, 77) (Fig. 4). Sin embargo, la mayoría de los nuevos compuestos son modificaciones químicas de clases de antibióticos ya existentes y parecen ser una solución a corto plazo, especialmente para aquellos patógenos con múltiples mecanismos de resistencia. Por ello, se requieren más inversiones para el

Introducción

descubrimiento y desarrollo clínico de antibióticos verdaderamente innovadores. Además, se deben hacer esfuerzos para garantizar el uso adecuado de los antibióticos recién aprobados y mantener su eficacia en la medida de lo posible (52).

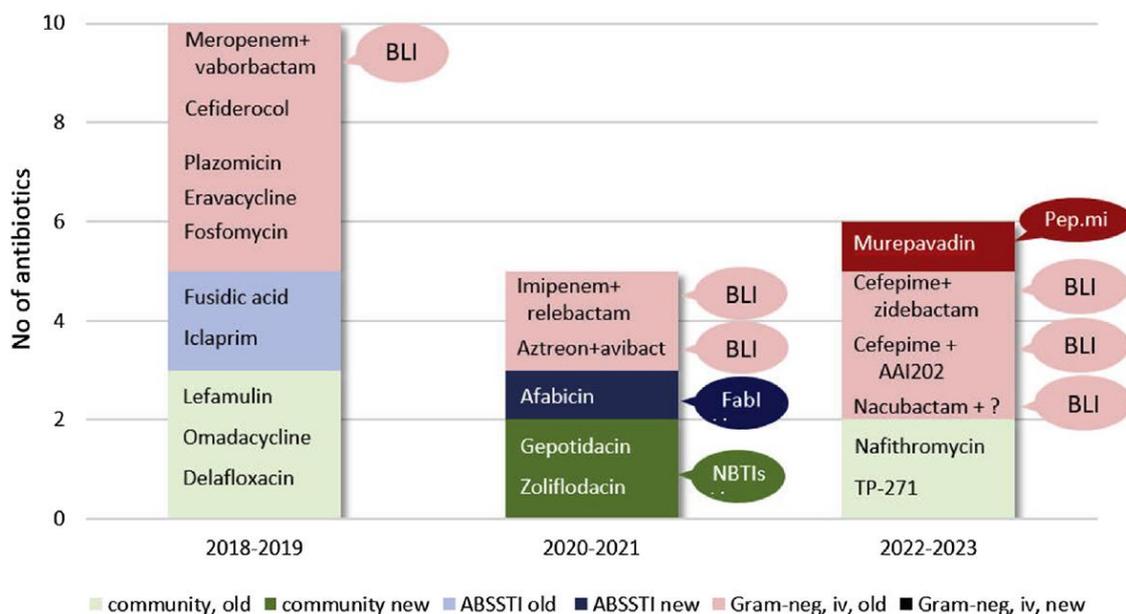


Figura 4. Antibióticos innovadores aprobados por la FDA (77).

2.2. Alternativas no antibióticas

El éxito de los antibióticos convencionales llevó a centrarse en el desarrollo de éstos, excluyendo otras estrategias antibacterianas. El incremento en la aparición de cepas resistentes ha llevado a la búsqueda activa de nuevas alternativas no antibióticas, aunque quedan desafíos importantes antes de que puedan adoptarse ampliamente en la práctica clínica (11, 12).

2.2.1. Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (AMPs, *antimicrobial peptides*) son mecanismos comunes de defensa del huésped y, en la mayoría de los casos, funcionan rompiendo las membranas bacterianas (14). Las desventajas en el desarrollo clínico de éstos son innumerables, siendo cuestionados cómo opciones terapéuticas viables en el tratamiento de infecciones sistémicas (78). Sin embargo, ofrecen un amplio espectro frente a BGN, una rápida acción bacteriana y baja probabilidad de desarrollar resistencias (79). Así, las proteínas híbridas de cecropina A-melitina han mostrado actividad bactericida *in vitro*

Introducción

frente a cepas de *A. baumannii* resistente, pero con una vida media muy corta, lo que limita su utilidad (80). Además, se encuentra en las secreciones cutáneas de muchas especies de ranas y sapos (81, 82). Estos péptidos son multifuncionales, ya que poseen propiedades inmunomoduladoras y quimioatrayentes, así como actividades citotóxicas, por lo que es mejor referirse a ellos como péptidos de defensa del huésped en lugar de exclusivamente como péptidos antimicrobianos (83, 84). Igualmente, en modelos murinos de bacteriemias o infecciones de heridas, el tratamiento con A3-APO (péptido rico en prolina) mejoró la supervivencia y disminuyó la carga bacteriana en comparación con tratamientos antibacterianos como el imipenem o la colistina (14). En el caso de los péptidos del sistema inmune innato humano, las beta-defensinas hBD-2, hBD-3 y hBD-4 han presentado actividad bactericida *in vitro* frente a cepas MR de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (85-88). Igualmente, el péptido catiónico de la familia de las catelecidinas, LL-37, mostró tener actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas MR de *A. baumannii*, previniendo la formación de biofilm (89, 90). A pesar de estos resultados prometedores, antes de que los péptidos antimicrobianos puedan utilizarse de manera segura, deben superar el problema farmacológico, la toxicidad y la inactivación en sustancias biológicas como suero, surfactante y otros fluidos y tejidos (91).

2.2.2. Fagoterapia

Los bacteriófagos son virus que abundan en el medioambiente y que invaden y lisan las bacterias (92), por lo tanto, parece un método emergente para el tratamiento de las infecciones bacterianas (93-95). Entre las ventajas de su uso frente a los antibióticos está, su alta especificidad, que no tienen efecto frente a células animales, y además, su aislamiento es un proceso relativamente rápido. En 2010, se identificaron AB1 y AB2 como los dos primeros fagos específicos frente a *A. baumannii*; desde entonces, muchos más han sido identificados (80, 96). Recientemente también se ha publicado un estudio en el que se ha utilizado esta opción como tratamiento contra una cepa de *A. baumannii* MR (92). Igualmente, frente a *P. aeruginosa*, existen estudios que han demostrado la buena actividad de estos frente a infecciones de heridas y quemaduras, para combatir el biofilm, o en infecciones pulmonares (97). Desafortunadamente, el uso de bacteriófagos tiene limitaciones que incluyen un rango limitado de hospedadores y la aparición de cepas resistentes (97).

2.2.3. Adyuvantes

Otra alternativa que se está analizando tanto *in vitro* como *in vivo* es el uso de adyuvantes, obteniéndose en ellos resultados prometedores (98). Hay un número importante de moléculas, con diferentes mecanismos de acción, que muestran actividad antimicrobiana específica o efectos sinérgicos en combinación con antimicrobianos sin actividad existente frente a cepas MR de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (99). También, se ha observado que pueden restaurar la actividad antimicrobiana de antibióticos, como la colistina, o que evaden el desarrollo de resistencias a los antimicrobianos después de la exposición a este patógeno (99). Existen estudios en modelos murinos causados por cepas de *A. baumannii*, que han probado que lisofosfatidilcolina (LPC), a pesar de no tener actividad bactericida, debido a su efecto modulador reduciendo citoquinas proinflamatoria, ha sido eficaz tanto sola como en combinación con antimicrobianos, aumentando el porcentaje de supervivencia, reduciendo la bacteriemia asociada y reduciendo el conteo bacteriano en tejidos (99, 100). Sin embargo, se deben realizar estudios más extensos, como toxicidad, problemas de estabilidad y resistencia cruzada con fármacos que ya están en uso clínico, y ensayos clínicos si los datos preclínicos lo justifican, para dar validez al uso de estos adyuvantes como alternativas terapéuticas (99).

2.2.4. Inhibición de factores de virulencia

Existen numerosos estudios en los que se intentan bloquear la actividad de factores de virulencia y, por lo tanto, detener la patogénesis dando tiempo a que la respuesta inmune del huésped o el tratamiento seleccionado actúen (11). Esta alternativa evita la presión selectiva y la aparición de mutantes resistentes. A modo de ejemplo, hay un estudio en el que diseñaron una serie de inhibidores de OmpA y evaluaron su eficacia, tanto *in vitro* como *in vivo*, frente a cepas clínicas de *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *E. coli* encontrándose un hexapéptido cíclico (AOA-2) que era capaz de inhibir la adhesión de estos patógenos a las células del huésped, evitando así la formación de biofilm y por lo tanto, el desarrollo de la infección. También se observó que fue eficaz en un modelo de sepsis murina, ya que consiguió reducir la carga bacteriana en los tejidos y los porcentajes de bacteriemia y mortalidad (101).

2.2.5. Inmunoterapia

La modulación de la respuesta inmune, se ha demostrado como una estrategia terapéutica ventajosa en la prevención y tratamiento de infecciones, la supresión de respuestas autoinmunes e inflamatorias y/o la estimulación de la inmunidad antitumoral en pacientes con cáncer (102, 103). Actualmente, los tratamientos inmunomoduladores disponibles se usan como antimicrobianos, corrigiendo generalmente un defecto adquirido o congénito del sistema inmune (104). En este momento, están diseñados como terapias complementarias que apoyan y aumentan la eficacia de antibióticos y/o antivirales (104). Por ejemplo, el interferón (IFN) tipo I se utiliza estimulando la respuesta inmunitaria de pacientes con infecciones virales (105). La vacunación, considerada también como terapia inmunomoduladora, es una de las formas más exitosas y rentables de intervención médica para la prevención de enfermedades infecciosas (104). En los últimos años, existen cada vez más estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, los cuales tratan de adaptar la respuesta inmune a través de vacunas (106-111). Además, los anticuerpos monoclonales (MoAb) son otro tipo de inmunomoduladores que han estado en uso durante varias décadas, con más de 20 terapias aprobadas solo en los EE.UU (112). Un estudio informó que un cuarto de todos los medicamentos biotecnológicos que se encuentran en desarrollo actualmente están basados en MoAb (113). Son al menos 400 MoAbs los que se encuentran bajo ensayos clínicos para tratar distintas enfermedades como cáncer, rechazo de trasplantes, enfermedades autoinmunes y en menor medida, enfermedades infecciosas (114-118). Sin embargo, cada vez son más las empresas interesadas en el estudio de estos anticuerpos frente a cepas MR (3). Recientemente se ha descrito un prometedor MoAb como posible terapia frente a infecciones letales de *A. baumannii* extremadamente resistentes, el cual presenta actividad opsonofagocítica en macrófagos murinos y humanos y mejora la supervivencia en modelos murinos de sepsis, bacteriemia y neumonía; además, presenta actividad sinérgica en combinación con colistina (119). Por tanto, es necesario conocer la respuesta celular a infecciones por bacterias MR para conseguir manipularla y aumentar la inmunidad del huésped frente a este tipo de patógenos. Una de las ventajas de la inmunoterapia es que se dirige al huésped lo que evita la presión selectiva y la consecuente aparición de mutantes resistentes. En este sentido, la caracterización de la base molecular y celular de la respuesta inmune puede proporcionar las herramientas necesarias para el desarrollo de tratamientos alternativos

Introducción

o inmunoterapias frente a infecciones causadas por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* (120).

3. Respuesta inmune en infecciones bacterianas

El sistema inmunitario comprende mecanismos de defensas refinados y específicos frente a los patógenos invasores y a sus factores de virulencia (121). Sin embargo, las funciones y los factores de las células inmunitarias no se limitan sólo a la defensa del huésped, sino que se extienden al desarrollo, homeostasis y reparación del tejido (122). Dentro de las características del sistema inmunitario podemos destacar: la cantidad de receptores antigénicos, la memoria inmunitaria, la cual genera respuestas inmunes mayores frente a reinfecciones de manera rápida, y la tolerancia inmunitaria, para evitar la lesión de la respuesta inmune en células del huésped (121). Sin embargo, la respuesta inmune es un proceso muy complejo que engloba muchísimas células, citoquinas, quimioquinas, etc., (122, 123) (Fig. 5).

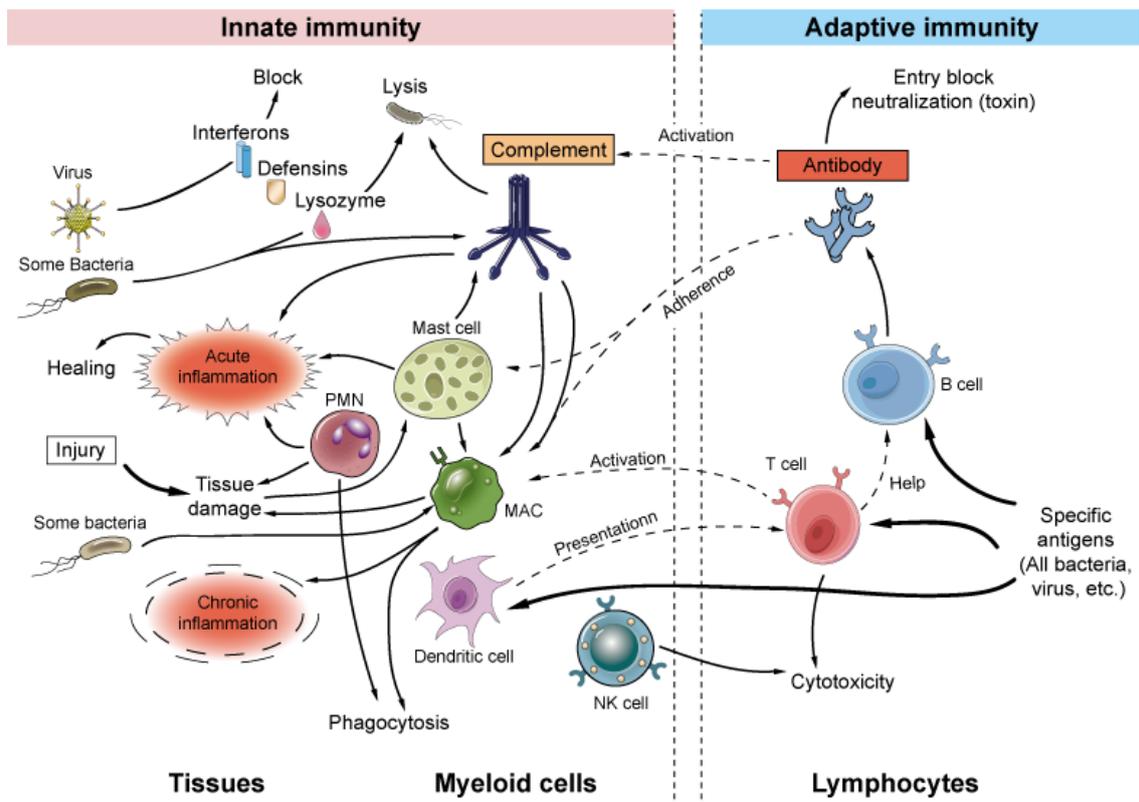


Figura 5. Control de las respuestas innata y adaptativa durante una infección (124).

Introducción

Durante una infección, se desencadena de manera rápida (minutos a horas) la inmunidad innata (125), siendo la primera línea de defensa del huésped a la infección. Normalmente, esta respuesta es suficiente para eliminar los patógenos, sin embargo en ocasiones puede no ser suficiente debido al número o a la virulencia de los patógenos causantes de la infección. En estas situaciones, los mecanismos inmunitarios adaptativos se activan, lo que permite el reconocimiento específico y la eliminación del patógeno, dicha respuesta tarda en establecerse semanas. La respuesta adaptativa, es importante para la defensa del huésped tanto en las fases finales de una infección como en infecciones secundarias, debido a su capacidad de guardar memoria y responder de manera más eficaz a la reinfección (123). La activación de esta segunda respuesta y la inducción de la memoria inmunitaria clásica en los linfocitos, depende del sistema inmune innato, en particular de las células presentadoras de antígenos, como células dendríticas (CD) (126). Los efectos posteriores a la activación de los linfocitos, se ejercen mediante la amplificación de respuestas inmunes innatas, como son la fagocitosis y la destrucción del patógeno (126).

En caso de infecciones crónicas, el sistema inmunitario desarrolla lo que se conoce como ganglio linfático en el sitio de la inflamación. Éste atrae linfocitos B y T, formando una estructura que incorpora vasos sanguíneos modificados y tejidos de soporte que aumentan la eficacia de las respuestas inmunitarias locales. Sin embargo, en algunos casos, como en las enfermedades autoinmunes, estos cambios representan un impulso inmunitario subyacente mayor que puede dañar el tejido sano (127).

3.1. Respuesta Inmune Innata

El sistema inmunitario innato es la primera línea de defensa frente a patógenos invasores (128). Estas defensas abarcan prácticamente todos los tejidos, particularmente las superficies de barrera, como la piel o las superficies mucosas del tracto respiratorio y gastrointestinal (129). Es capaz de detectar los patógenos mediante receptores codificados en la línea germinal denominados PRR (*Pattern Recognition Receptor*) o receptores de reconocimiento de patrones, como los receptores tipo toll (TLR) o tipo NOD (NLR) (129, 130). Estos receptores reconocen patrones moleculares asociados a patógenos o (PAMP, *Pathogen Associated Molecular Patterns*), que son moléculas o estructuras muy conservadas en familias enteras de patógenos (130). La respuesta inmune innata puede estar mediada por mecanismos dependientes de las células, como

Introducción

la fagocitosis o citotoxicidad o por factores secretados, entre los que se encuentran: AMPs (129), factores del complemento (131-133), citoquinas/quimioquinas y proteasas (134). Tras una infección, los receptores correspondientes inducen la secreción de citoquinas y quimioatrayentes, formando un gradiente que hace que las células inmunes innatas migren hacia el órgano diana infectado (135). Las células involucradas en esta respuesta son neutrófilos, monocitos, macrófagos y CD, las cuales interactúan con el sistema inmunitario adaptativo (128). Los neutrófilos son las primeras células en llegar al foco de la infección, seguidas de monocitos y células dendríticas, que luego pueden interactuar con células mieloides y linfoides residentes en el tejido. La activación de los neutrófilos mediante la estimulación de sus receptores PRR da como resultado que estas células empleen funciones efectoras versátiles, incluida la fagocitosis, la degranulación y la formación de una malla de ADN que encierra histonas y proteínas antimicrobianas, que liberan al espacio extracelular denominada trampa extracelular de neutrófilos (NET) (136).

3.1.1. Respuesta inmune innata frente a infecciones causadas por *A. baumannii*

En la actualidad, la información sobre la respuesta celular innata frente infecciones causadas por cepas de *A. baumannii* MR, es escasa (120), centrándose la mayoría de los estudios en la producción y modulación de citoquinas pero no en la respuesta celular. Existen varios estudios en modelos murinos tanto de neumonía como de bacteriemia como de infección de heridas que destacan la importancia de los neutrófilos en el control inicial de infecciones causadas por este patógeno (137-139). Además es conocida una mayor tasa de prevalencia a infecciones causadas por *A. baumannii*, en pacientes con neutropenia (140). Un estudio realizado en un modelo de neumonía en ratones neutropénicos demostró que el reclutamiento de neutrófilos al foco de la infección se produce rápido (4h), alcanzando su pico tras 24h de la infección, además estos ratones se asociaron a una mayor mortalidad y severidad de la infección, junto al retraso asociado a la producción de citoquinas y quimioquinas involucradas en el reclutamiento de neutrófilos (120). Estos resultados fueron confirmados también por Tsuchiya *et al* (137). Además, Qui *et al.*, demostraron que este retraso en la producción de estas moléculas producía un aumento de la carga bacteriana y de la diseminación (141). Las señales quimioatrayentes que reclutan neutrófilos y otros tipos de células, durante este tipo de infecciones, son producidas por quimioquinas, metabolitos bacterianos (142) y AMPs producidos por el huésped como LL-37 (90). Se ha

Introducción

demostrado además, que aparte de los neutrófilos, hay otros tipos celulares que activan la respuesta inmunitaria frente a *A. baumannii* (120). En el caso de los macrófagos, como los alveolares, estos pueden fagocitar y ayudar a controlar la infección mientras los neutrófilos llegan al sitio de la infección (141). Igualmente, las células *Natural Killers* (NK) actúan indirectamente en la defensa frente este patógeno, mediante la producción de quimioatrayentes que reclutan neutrófilos (120). En un modelo murino de neumonía causado por *A. baumannii*, la depleción de células NK estuvo asociado con el aclaramiento bacteriano en pulmón y, por lo tanto, con la resolución de la infección (137). Finalmente, las CD son el puente de unión entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, las cuales se activan. Estas se activan en respuesta al LPS de *A. baumannii* (120).

Por otro lado, el papel de los receptores TLR (TLR-2, TLR-4 y TLR-9) también ha sido estudiado en la respuesta inmune frente a *A. baumannii* (120, 143). En estudios experimentales en infecciones pulmonares, comprobaron que ratones deficientes en TLR-4 tenían menor reclutamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMN) en los pulmones, y por lo tanto una disminución de la inflamación (144). Otros estudios en ratones deficientes de TLR-2, demostraron que estos animales tenían menor carga bacteriana y un reclutamiento más temprano de PMN al pulmón (145, 146). Finalmente, estudios en ratones deficientes en TLR-9 demostraron que estos eran más sensibles a la infección por *A. baumannii* (120).

3.1.2. Respuesta inmune innata frente a infecciones causadas por *P. aeruginosa*

Cómo se ha visto en el apartado anterior, la información sobre la respuesta celular innata a infecciones causadas por *P. aeruginosa* también es escasa. Durante la infección, los macrófagos y los neutrófilos fagocitan preferentemente las bacterias móviles, independientemente de la opsonización (147). Los mecanismos de fagocitosis no están bien definidos, pueden ser específicos de la cepa y pueden requerir de los flagelos de *P. aeruginosa*, del receptor 3 del complemento de macrófagos (CR3) o de CD14 (148). Los anticuerpos (IgA, IgG), el sistema del complemento y la proteína tensioactiva A opsonizan a este patógeno y mejoran la captación fagocítica (148). También libera toxinas que inducen apoptosis (149, 150) y alteran la ingesta de células apoptóticas por macrófagos (151). Se ha observado en un modelo murino de neumonía por *P. aeruginosa*, que los macrófagos y neutrófilos fueron sensibles a la citotoxicidad

Introducción

de la toxina ExoS (152). Los neutrófilos normalmente son las primeras células de defensa de la respuesta inmune innata (136), desempeñando un papel principal en la conducción de la inflamación y el daño tisular dentro del pulmón en pacientes con fibrosis quística (153). Los neutrófilos contienen gran variedad de compuestos antimicrobianos en sus gránulos, incluidos proteasas, AMPs como LL-37, ADN extracelular (ADNp) y especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*), que eliminan la infección y modulan la respuesta inmune (154, 155). Sin embargo, en caso de infecciones crónicas por *P. aeruginosa*, estos compuestos pueden producirse en exceso y tener efectos directamente tóxicos en el huésped (156); a modo de ejemplo, pueden producir una elevada concentración de IL-8, una citoquina proinflamatoria que contribuye al reclutamiento de neutrófilos, con lo que un aumento en los niveles de esta puede producir daños inflamatorios en el tejido (157).

También se ha observado que este patógeno forma biofilm en los pulmones con infecciones crónicas (158). Además, la interacción de los neutrófilos con el biofilm, produce una inmovilización de las células inmunes que le impiden eliminar al patógeno (159) y de esta manera poder prosperar dentro del pulmón con fibrosis quística (136).

Por otro lado, se ha demostrado que tanto el flagelo como el LPS de *P. aeruginosa* son PAMP, y por tanto su regulación o modificación permitiría la evasión del reconocimiento de las células inmunes, una reducción del reclutamiento de fagocitos, y una disminución de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (136). Además, un MoAb humano anti-LPS, fue eficaz y seguro en el ensayo clínico de fase IIa en pacientes con neumonía nosocomial causada por *P. aeruginosa* (160).

3.2. Respuesta Inmune Adaptativa

Cómo se comentó anteriormente, las CPA, cómo las CD, son el puente de unión entre la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. La activación de esta respuesta se puede agrupar en tres fases: i) la regulación positiva de la actividad lisosomal, que resulta en la degradación eficiente y la carga de péptidos derivados del patógeno en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*) I o II para su presentación a los linfocitos T; ii) el aumento de la expresión de moléculas co-estimulantes, como CD80 y CD86, en la superficie celular, necesarios para la activación de los linfocitos T y iii) la regulación positiva y la liberación de citoquinas,

Introducción

que pueden actuar directamente sobre las células inmunitarias (161). Una de las características de la inmunidad adaptativa es la capacidad de generar memoria inmunitaria, lo que haría que un segundo encuentro con un antígeno originase una respuesta mucho más rápida e intensa. Además, dentro del sistema inmune adaptativo podemos hablar de inmunidad celular e inmunidad humoral, siendo los linfocitos T, los efectores principales de la inmunidad celular, mientras que los linfocitos B lo son en la inmunidad humoral (121). Tanto los linfocitos T como los linfocitos B realizan funciones inmunitarias y cada uno de ellos, cuando recibe las señales adecuadas, pasa a través de estadios, desde la activación y la inducción, hasta las funciones efectoras, pasando por la proliferación y la diferenciación. La función efectora expresada puede ser el punto final de una respuesta, como la secreción de anticuerpos por una célula plasmática diferenciada, o actuar como función reguladora que module otras funciones, como sucede en los linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ que regulan la diferenciación de los linfocitos B y la activación de los linfocitos T citotóxicos CD8⁺ (121).

Las células T efectoras, detectan antígenos peptídicos derivados de los de patógenos. Los péptidos intracelulares, se presentan en la superficie celular a través del MHC-I, siendo reconocidos por los linfocitos T CD8⁺. Los antígenos peptídicos derivados de patógenos y toxinas extracelulares, son presentados en la superficie celular por el MHC-II, siendo reconocidos por los linfocitos T CD4⁺ (linfocitos T colaboradores). Los linfocitos CD4⁺ al contrario que sucede con los linfocitos CD8⁺, no tienen actividad citotóxica o de fagocitosis, pero gestionan la respuesta inmune dirigiendo a otras células para realizar estas tareas. Los linfocitos T CD4⁺ colaboradores (o inductores) pueden subdividirse en función de las citocinas que producen. Por este motivo, el tipo de respuesta celular T generada en una reacción inmunitaria depende de los PAMP microbianos que se presenten a las DC, de los TLR en las CD que se activen, de los tipos de CD que se activen y de las citocinas que se produzcan. Una variedad importante de linfocito T inmunomodulador que regula las respuestas inmunitarias es el linfocito T regulador CD4⁺ y CD8⁺. Estos son inducidos por las CD inmaduras y tienen una función muy importante en conservar la tolerancia hacia los autoantígenos en la periferia. Además, participan en la regulación de la magnitud y duración de las respuestas inmunitarias a los microorganismos: de este modo, una vez se ha eliminado al microorganismo, estos se activan para suprimir la respuesta contra el microorganismo y para prevenir el daño al hospedador. Algunos microorganismos se han adaptado para

Introducción

inducir la activación de los linfocitos T reguladores en el sitio de la infección y facilitar la infección y supervivencia de los parásitos (121).

Por otra parte, los linfocitos B expresan en su superficie moléculas de inmunoglobulinas (Ig) intra-membranas que actúan como receptores altamente específicos de los linfocitos B (BCR) a través de los cuales reconocen al antígeno (162, 163). Sin embargo requieren de la ayuda de los linfocitos T para generar anticuerpos de gran afinidad de isotipos múltiples que proporcionen inmunidad humoral a través de neutralización u opsonización del antígeno (162).

3.2.1. Respuesta inmune adaptativa frente a infecciones causadas por *A. baumannii*

La información sobre la contribución de las células del sistema inmunitario adaptativo en el control y la resolución de las infecciones por *A. baumannii* es igualmente escasa, siendo en este caso la inmunidad humoral más explorada en el intento de diseñar una vacuna eficaz y segura. Se han propuesto antígenos bacterianos como candidatos para el desarrollo de vacunas (164, 165). Los modelos que se conocen sobre inmunidad activa para prevenir infecciones causadas por *A. baumannii* están basados en el empleo de células completas inactivadas o atenuadas (107, 108). Existen publicaciones que emplean las proteínas principales de la membrana externa de *Acinetobacter*, como OmpA (166), Omp22 (167), OmpW (168), la nucleasa de la membrana externa (NucAb) (169) o las proteínas Bap (170). En contraste, en la inmunización pasiva, los anticuerpos podrían administrarse y resultar en una protección inmediata, sin tener que esperar una respuesta de linfocitos a una vacuna. De hecho, la transferencia pasiva de suero inmune anti-OmpA, anti OmpW o anti-Nuc Ab policlonal de ratones vacunados transfirió la protección a ratones receptores (168, 169, 171). Sin embargo, la OmpA parece una buena opción, dada su alta inmunogenicidad (171, 172) y su amplia distribución en *A. baumannii* (120). Además se han estudiado diferentes anticuerpos anti-*A. baumannii* observándose que OmpA es un antígeno capaz de promover una respuesta de anticuerpos humorales. En un modelo murino usando ratones diabéticos se demostró que tanto la inmunización activa como la pasiva con OmpA confiere protección frente a este patógeno (173). En otro estudio, se confirmó que la opsonización bacteriana es uno de los mecanismos a través de los cuales los anticuerpos anti-OmpA específicos ejercen protección, lo que lleva a un incremento en la fagocitosis mediada por macrófagos

Introducción

(174). También se ha observado que la inmunización con el recombinante de OmpA en ratones, además de producir anticuerpos específicos IgG1 y activar a los esplenocitos para que produzcan IFN- γ , IL-4 e IL-17 de una manera específica para el antígeno, dependiendo de la dosis del antígeno y del resultado de dicha inmunización da perfiles de citoquinas diferentes (171). En otro estudio se presentó una estrategia para la generación de vacunas con células completas de cepas auxotróficas para D-Glutamato. Estas vacunas mostraron una atenuación de la virulencia y un crecimiento autolimitado en ratones, provocando anticuerpos funcionales y con reactividad cruzada, así como inmunidad celular (108). Estas respuestas se correlacionan con la protección contra la infección letal aguda con otras cepas de la misma especie (108).

3.2.2. Respuesta inmune adaptativa frente a infecciones causadas por *P. aeruginosa*

Los antígenos de *P. aeruginosa* son captados, procesados y presentados principalmente por CD a las células T (175, 176), existiendo otras CPA, como los linfocitos B y macrófagos capaces de hacerlo (177). La respuesta inmune adaptativa más robusta activada por este patógeno sucede en los ganglios linfáticos, donde las CD migratorias interactúan con los linfocitos T para generar e inducir la proliferación de linfocitos T específicos de antígeno (176, 178). Se ha observado que la activación de los linfocitos T, se produce principalmente en los ganglios linfáticos, aunque puede ocurrir también en los tejidos linfoides asociados a bronquios (BALT), donde se generan distintos subconjuntos de linfocitos T (179). Los subconjuntos de linfocitos T CD4 que se producen tras la respuesta inmune de *P. aeruginosa* incluyen células Th17 y Th22 (180), que secretan citoquinas (IL-17, IL-22) para promover la organización de linfocitos B y T en BALT (179). Además, IL-17 contribuye a la linfangiogénesis dentro de BALT, lo que permite un mayor reclutamiento de células inmunitarias innatas y adaptativas en el tejido pulmonar (181). Igualmente, IL-17 e IL-22 son importantes en la defensa del huésped, cómo demuestran estudios murinos experimentales en los que su eliminación o bloqueo aumentan la lesión pulmonar y la mortalidad (182, 183). Asimismo, se demostró en un modelo murino de neumonía por *P. aeruginosa*, la importancia de un subconjunto de linfocitos T productores de IL-17 para la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B en el suero y en el líquido de lavado bronquial(184). Las respuestas inmunitarias adaptativas que involucran a subconjuntos de linfocitos, junto a los mecanismos de defensa innatos del huésped, proporcionan

Introducción

información sobre la fisiopatología de la neumonía causada por *P. aeruginosa* (148). Además, existen estudios sobre los efectos de algunos factores de virulencia de *P. aeruginosa* en la respuesta inmune, como Cif (Factor inhibidor del transportador CFTR), observándose que es capaz de suprimir la presentación de antígenos bacterianos y virales a través del complejo MHC-I (185). También, se ha demostrado que el biofilm provocado tras una infección por *P. aeruginosa* distorsiona las respuestas celulares de Th1 y Th2 (186, 187).

Las nuevas tecnologías, como el ARN-seq están ayudando a definir qué factores de virulencia bacterianos son más importantes para cada tipo de infección (188). Así, existen estudios experimentales que demuestran que la proteína estructural del T3SS de *P. aeruginosa*, PcrV, es una diana ideal para la prevención y tratamiento de estas infecciones. Por este motivo, se han realizado estudios que buscan la producción de un derivado de PcrV optimizado con resultados prometedores para el diseño de una vacuna candidata frente a este patógeno (189).

4. Inmunoterapia en infecciones bacterianas

Debido al aumento de cepas sin tratamientos eficaces se hace urgente la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Como ya se ha comentado anteriormente, la inmunoterapia es una de las opciones futuras para el tratamiento de las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos o alternativas convencionales. El objetivo es diseñar mecanismos de interrupción específica de las respuestas inmunitarias patológicas, dejando intactas las respuestas inmunitarias normales (121). Esta terapia va dirigida a modular la respuesta inmune, ya sea a través de vacunas o aumentando la respuesta inmune del huésped. Por un lado, si la respuesta del huésped es demasiado “débil”, podría ser beneficioso un enfoque dirigido a la regulación positiva de esta respuesta, es decir, inclinar la balanza hacia una respuesta exitosa y poderosa del huésped. Por otro lado, si esta respuesta es demasiado “fuerte”, la regulación a la baja de esta podría proteger al huésped contra las consecuencias perjudiciales de la hiperactivación, y en este caso el objetivo de esta terapia sería reforzar los procesos inflamatorios (190). Algunas de las formas de interrumpir las respuestas inmunitarias patológicas que se están investigando son: la utilización de citoquinas antiinflamatorias o de inhibidores específicos de estas como fármacos antiinflamatorios; el uso, como fármacos terapéuticos, de MoAb dirigidos contra linfocitos T o B; el empleo de Ig

Introducción

intravenosa (IgIV) para ciertas infecciones y enfermedades mediadas por complejos inmunitarios; la utilización de citoquinas específicas para reconstituir los componentes del sistema inmunitario, y el trasplante de médula ósea para reemplazar al sistema inmunitario patógeno por sistema inmunitario normal o estimular la respuesta celular defensiva por activación del sistema de linfocitos T (121).

Las estrategias basadas en la inmunoterapia tienen muchos beneficios como, reducir las tasas de infecciones causadas por bacterias difíciles de tratar, así como la morbi-mortalidad asociada a estas, reducir la prescripción antibiótica y con ello la presión antibiótica intrahospitalaria (191, 192) y actuar de manera focalizada sobre los patógenos externos, sin afectar a las bacterias no patógenas propias de la flora normal del individuo (193-195).

4.1. Inmunoterapia adoptiva con células de memoria

Cómo es bien conocido, la memoria inmunológica proporciona al huésped una respuesta rápida y eficaz frente al patógeno (126). Esta memoria, es una característica conocida tanto del sistema inmune innato (inmunidad entrenada) como del adaptativo. Aunque los mecanismos y propiedades por los cuales se inducen son distintos, ambas se complementan para mejorar la defensa del huésped frente a los patógenos (126). La memoria inmune innata es una forma de adaptación en la defensa del huésped, resultante de la reorganización de la cromatina, que proporciona una respuesta incrementada no específica (196). Al contrario, la memoria inmune adaptativa, presenta una magnitud de respuesta mayor y con especificidad (126) (Fig. 6). Las propiedades de mayor velocidad de respuesta y mayor magnitud están mediada por la programación epigenética, mientras que, la especificidad esta mediada por la recombinación de genes de los receptores BCR y de los linfocitos T (TCR) y la expansión clonal de subpoblaciones celulares específicas en el reconocimiento de antígenos (126). Las principales poblaciones celulares responsables de la memoria inmune innata son los monocitos, los macrófagos y las células NK (196). Existen estudios murinos experimentales y en pacientes que demuestran esta inmunidad entrenada (196, 197). Además, recientemente se ha propuesto una extensión de este concepto para incluir células no inmunes, como son las células epiteliales (198). Centrándonos en la memoria del sistema inmune adaptativo, esta está mediada por linfocitos B y T, que expresan receptores altamente específicos de antígeno, como son BCR y TCR. Existen

Introducción

numerosos estudios sobre el papel que desempeñan los linfocitos B y T (199, 200) y del desarrollo de memoria por estos. Las células B se desarrollan en dos tipos de células inmunológicas. Las células plasmáticas, las cuales se localizan en la médula ósea o en los tejidos de la mucosa y producen anticuerpos de alta afinidad durante muchos años y las células de memoria que no secretan activamente el anticuerpo, pero permanecen en la circulación y en el tejido de la mucosa a largo plazo. Las células T de memoria también experimentan cambios en sus requisitos internos para la activación. Estas tienen un umbral inferior para la activación, se activan por señales que las células *naïve* ignoran y su esperanza de vida es mayor. Además, algunas subpoblaciones de linfocitos T se alojan en los tejidos donde se produjo la infección por primera vez (127).

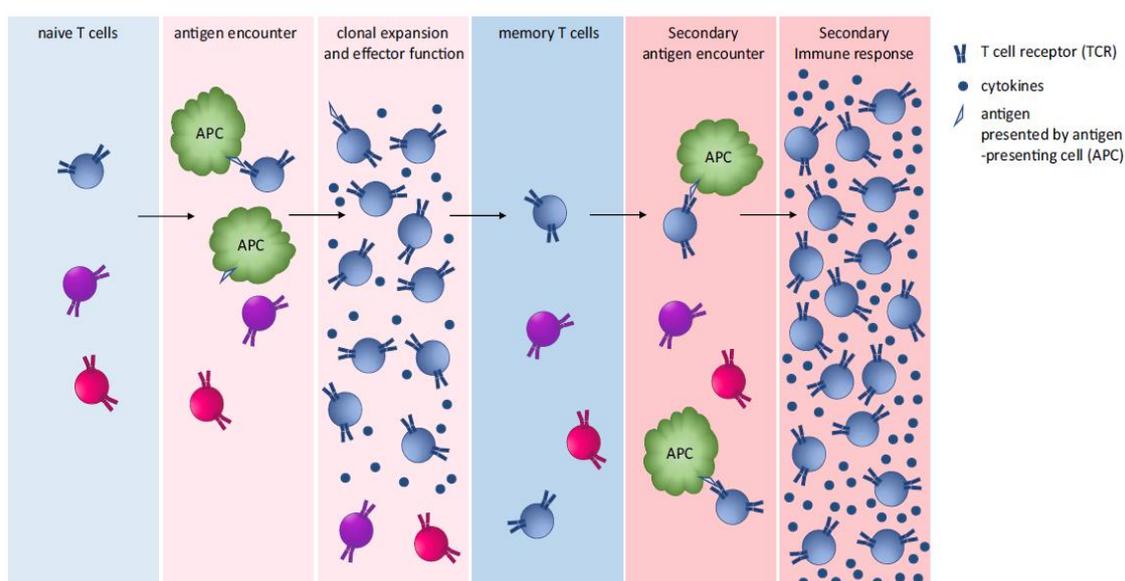


Figura 6. Memoria del sistema inmune adaptativo: Reconocimiento antigénico y expansión clonal (126).

4.2. Inmunoterapia pasiva con inmunoglobulinas

La inmunoterapia pasiva, ya sea a través de anticuerpos monoclonales o a través de Ig, puede ser una alternativa a las opciones de tratamiento actualmente disponibles (201). En ocasiones, el huésped no es capaz de sintetizar suficientes Ig, esto puede deberse a que sean muchos los anticuerpos que se unan a los patógenos durante la infección grave, y agoten el conjunto general de anticuerpos. Estos son secretados por células B estimuladas, las cuales se convierten en células plasmáticas y producen (202) IgG, IgM, IgA, IgE, IgD de alta afinidad (203, 204). IgG, isotipo principal en el suero, consta de cuatro subtipos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), y es el único isotipo capaz de cruzar la

Introducción

barrera placentaria para proporcionar inmunidad al feto (205). IgM, se produce en la etapa temprana de defensa a una infección (204, 206), reconociendo y eliminando de manera efectiva a los patógenos gracias a la activación y opsonización del complemento (206). IgA, se encuentra presente en las superficies mucosas, desempeñando un papel esencial en la inmunidad de estas (207, 208). IgD, es altamente específica para comensales respiratorios (209), aunque su papel biológico sigue siendo desconocido. En general, los anticuerpos específicos provocan una defensa mediada por la activación del sistema del complemento, la neutralización de patógenos, la fagocitosis de células apoptóticas y el reclutamiento de células inmunes (204). Se ha observado en varios estudios que la combinación de IgIV con antimicrobianos es un tratamiento eficaz para las enfermedades infecciosas graves (210), pudiendo ser una opción de tratamiento a infecciones severas causadas por BGN MR. La IgIV contiene anticuerpos específicos de bacterias o toxinas producidas por éstas. Aunque, el mecanismo subyacente a la actividad antibacteriana sigue siendo desconocido, se piensa que viene mediado por la lisis bacteriana, la neutralización de toxinas, su capacidad para aumentar la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos y/o la opsonización (210). Existen estudios *in vitro*; que muestran que la IgIV aumenta la actividad bactericida de los neutrófilos mediante la fagocitosis de cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* MR y sensibles (210).

En la actualidad, la mayoría de preparaciones disponibles contienen sólo IgG, y varios estudios no pudieron demostrar el beneficio de éstas en la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas. Sin embargo, es conocido que la IgM juega un papel fundamental (Fig. 7), pudiendo ser útil la producción de un compuesto que combine IgG con IgA e IgM (201). Por este motivo, hay preparaciones de IgIV enriquecidas con IgM, (209), las cuales podrían ser una alternativa prometedora, ya que se ha visto que aumenta la eficacia protectora contra algunas cepas, debido probablemente a los anticuerpos dirigidos contra los carbohidratos de la pared celular (201). La eficacia de las IgIV enriquecidas en IgM sobre la IgIV con IgG estándar se confirmó cuando se evaluó el contenido de anti-LPS y la actividad opsonizante de ambos (211). Además, se ha observado que estas IgIV enriquecidas en IgM son beneficiosas como terapias complementarias en la sepsis o el shock séptico (212-216).

Introducción

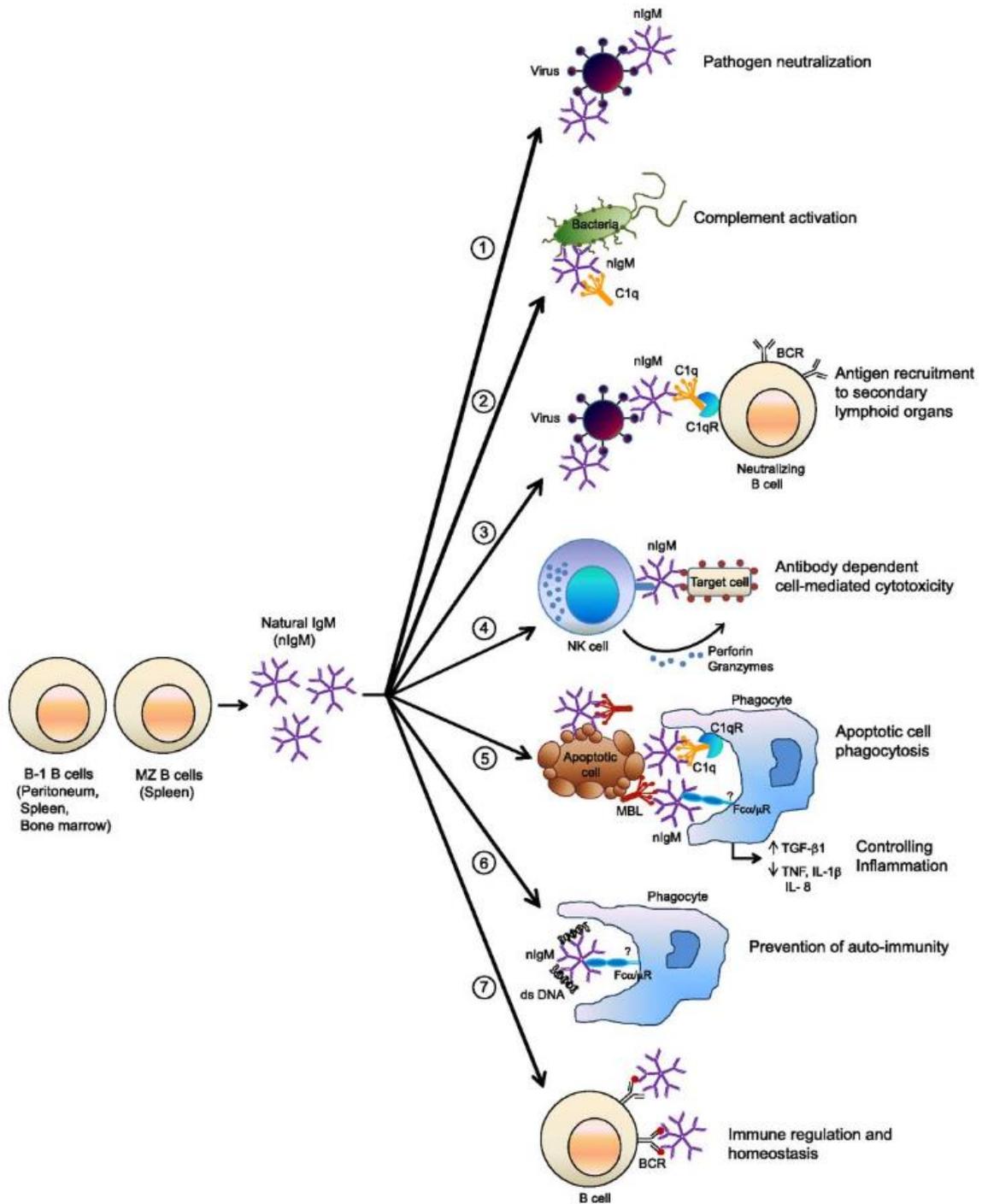


Figura 7. Funciones de la IgM en la inmunidad (204).

FUNDAMENTOS

Fundamentos

El aumento creciente de las resistencias microbianas al que nos enfrentamos mundialmente, que ha llevado en ocasiones a que no existan opciones óptimas frente a infecciones causadas por BGN, como son *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, hace necesaria y urgente la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento y el control de este tipo de infecciones.

Para ello, existen estrategias antimicrobianas como son la sinergia entre combinaciones de antimicrobianos, el rescate de antiguos antibióticos, como colistina y fosfomicina, aunque ya existen estudios que demuestran la aparición de cepas resistentes a éstos, o el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Sin embargo, el desarrollo de nuevos antibióticos en el mercado farmacéutico se ha reducido, haciendo que nos enfrentemos en ocasiones con la situación del aumento de resistencia frente a antimicrobianos y la no existencia de medicamentos nuevos.

Igualmente, existen aproximaciones no antimicrobianas cómo son la síntesis de péptidos sintéticos, el uso de adyuvantes para mejorar la eficacia de los antimicrobianos existentes, el reciclamiento de fármacos como agentes antimicrobianos, la terapia con bacteriófagos, la modulación de la microbiota, o la inmunoterapia, en la cual se centra esta tesis. Para llevar a cabo esta alternativa, es necesario entender la base de las interacciones entre huésped y patógeno, con el fin de modular las células del sistema inmunitario y mejorar la respuesta inmunitaria a las infecciones.

Por tanto, y sabiendo que el aclaramiento bacteriano y la resolución de la infección dependen no sólo del efecto bactericida de los antibióticos sino también de la respuesta inmune del huésped, nos planteamos conocer en detalle la respuesta celular que desencadena la infección pulmonar experimental causada por los BGN *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, con la finalidad de utilizar un tratamiento único o combinado, mediante inmunoterapia celular o humoral, frente a infecciones causadas por a estas bacterias causantes de infecciones graves en seres humanos.

HIPÓTESIS

Hipótesis

Las hipótesis del estudio son:

Capítulo 1

1. La respuesta celular innata (neutrófilos, monocitos, macrófagos) puede modificar la evolución de la infección pulmonar causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* con distinto patrón de resistencia a colistina.
2. La respuesta celular adaptativa (Linfocitos B y T) puede modificar la evolución de la infección pulmonar causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* con distinto patrón de resistencia a colistina

Capítulo 2

1. La transferencia de linfocitos T CD8+ de memoria es eficaz en el tratamiento de la neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii*, con distinto patrón de resistencia a colistina.
2. La transferencia de linfocitos B de memoria es eficaz en la neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, con distinto patrón de resistencia a colistina.

Capítulo 3

1. El tratamiento con inmunoglobulinas enriquecidas en IgM en monoterapia y/o en combinación con antimicrobianos es eficaz en la neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, con distinto patrón de resistencia a colistina.

OBJETIVOS

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es caracterizar la respuesta celular innata y adaptativa en la neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* con diferente patrón de resistencia a colistina, para identificar las poblaciones celulares más eficaces en la resolución de las infecciones pulmonares causadas por este tipo de patógenos y ser capaces de modular la respuesta celular con la finalidad de aumentar la inmunidad del huésped y resolver estas infecciones. Además, estudiar la eficacia del tratamiento en la neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* con distinto patrón de resistencia a colistina, mediante transferencia de células de memoria o inmunoglobulinas enriquecidas en IgM, en monoterapia o en combinación con otros antibióticos.

Los objetivos específicos son:

Capítulo 1

1. Caracterizar modelos no letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina.
2. Caracterizar la respuesta celular innata (monocitos, macrófagos y neutrófilos) frente a modelos no letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* con diferente patrón de resistencia a colistina.
3. Caracterizar la respuesta celular adaptativa (linfocitos T y B) frente a modelos no letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina.

Capítulo 2

1. Estudiar la eficacia del tratamiento con linfocitos T CD8+ de memoria en la neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii*, con diferente patrón de resistencia a colistina.

Objetivos

2. Estudiar la eficacia del tratamiento con linfocitos B de memoria en la neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina.

Capítulo 3

1. Estudiar la eficacia del tratamiento con inmunoglobulinas enriquecidas en IgM, en monoterapia y en combinación con otros antimicrobianos, en la neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y métodos

1. Cepas bacterianas

Para el estudio se utilizaron cuatro cepas clínicas MR. Dos cepas de *A. baumannii*, una sensible a colistina (Ab CS01) y otra resistente a colistina (Ab CR17), ambas aisladas del líquido cefalorraquídeo de un mismo paciente con meningitis (217). Y dos cepas de *P. aeruginosa* una sensible a colistina (Pa 147) y otra resistente a colistina (Pa M1) (218), ambas provenientes de la colección de cepas del estudio de bacteriemia de cohorte clínica realizado por la REIPI (Red Española de Investigación en Patología Infecciosa).

2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos inmunocompetentes C57BL/6J de aproximadamente 20 gramos (7-9 semanas de edad). Para los objetivos de los capítulos 1 y 2 se usaron animales suministrados por el Centro de Producción y Experimentación animal de la Universidad de Sevilla, para los objetivos del capítulo 3 los animales usados fueron suministrados por *Charles River laboratories*, Francia, contando en cualquiera de los casos con el certificado sanitario de SPF (*specific pathogen free*) y de autenticidad genética. Antes del inicio de los estudios experimentales, se obtuvo la aprobación del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEAA) del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla (0784-N-15) y del Ministerio de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural (11-09-15-322). Los animales tuvieron en todo momento acceso a comida y bebida *ad libitum*. Este estudio se realizó siguiendo las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (219).

3. Estudios *in vitro*.

3.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

El estudio de la CMI se realizó mediante la técnica de microdilución en caldo siguiendo los criterios establecidos en el *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI) (220). Para ello, se utilizaron placas de microdilución de 96 pocillos fondo “U”, conteniendo 50 µl de *Müller Hinton Broth II* (MHBII) a los que se añadieron 100µl totales de los antimicrobianos: amikacina, gentamicina, ceftazidima, cefepima, meropenem, ticarcilina, colistina, ciprofloxacino, tigeciclina y sulbactam. A continuación, se realizaron diluciones seriadas 1:2 a partir de la concentración inicial de cada

Materiales y métodos

antimicrobiano. El rango de concentraciones estudiadas fue: de 256 µg/ml a 0,5 µg/ml para las cepas de *A. baumannii* y de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml para las cepas de *P. aeruginosa*. Finalmente, se añadieron 50 µl de cada una de las cepas a testar ajustadas a la concentración 5×10^5 UFC/ml, y obtenidas de un cultivo en fase de crecimiento logarítmico (4 horas) en medio líquido MHBII a una temperatura de 37 °C, en aerobiosis y sin atmósfera de CO₂.

Se realizaron, además, controles de crecimiento (CC) con inóculo bacteriano y sin antibiótico y controles de esterilidad (CE) sin antibiótico y sin inóculo bacteriano. Como cepas controles se utilizaron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Todas las placas se incubaron en aerobiosis a 37 °C y sin atmósfera de CO₂ durante 18-24 horas. Tras ese período se realizó la lectura de las mismas, definiendo como CMI la concentración más baja de antimicrobiano a la cual el medio no presentaba turbidez macroscópicamente visible. Para la definición de sensibilidad y resistencia de los diferentes antimicrobianos se utilizaron los criterios definidos en el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (221), excepto para ceftazidima, cefepima, y sulbactam para *A. baumannii* que utilizamos el CLSI, ya que en el EUCAST no estaban definidos dichos puntos. Actualmente, no hay criterios de susceptibilidad establecidos ni en EUCAST ni en CLSI para tigeciclina en ninguno de los dos patógenos estudiados, ni para sulbactam en *P. aeruginosa*. Los estudios se realizaron por triplicado.

3.2. Concentración Mínima Bactericida (CMB)

El cálculo de la CMB se realizó mediante la siembra en placas de agar-sangre (Agar-Sangre Columbia, *Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EE.UU.*) de 10 µl del último pocillo con crecimiento visible en el estudio de la CMI y de todos aquellos que no presentaron turbidez, incubándose posteriormente estas placas en aerobiosis a 37 °C y sin atmósfera de CO₂ durante 18-24 horas. Se consideró como CMB la concentración más baja de antibiótico que reducía el inóculo inicial en un 99,9% (222).

4. Caracterización de modelos murinos no letales de neumonía

Para la producción de los modelos no letales de neumonía experimental en ratón se realizó una modificación en los modelos de neumonía murinos previamente utilizados en nuestro grupo (223).

4.1. Preparación del inóculo bacteriano

La preparación de los inóculos se realizaron a partir de colonias frescas recuperadas de placas de agar-sangre tras pases *overnight* (o/n) de cultivo. Estas se resuspendieron en 20 ml de medio MHB y se incubaron durante 18-20 horas en agitación a 37 °C en aerobiosis. Inmediatamente antes de la inoculación, los cultivos en MHB se centrifugaron y se resuspendieron en suero fisiológico estéril. A partir de estos inóculos se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar las concentraciones deseadas que permitieron caracterizar los modelos no letales de neumonía experimental causados por cepas de *A. baumannii* y de *P. aeruginosa*.

4.2. Anestesia e inoculación

Los animales se anestesiaron mediante la administración de 20 µl de ketamina/diazepam por vía intraperitoneal (i.p.). Una vez anestesiados, se inocularon grupos de 6 ratones intratraquealmente con 50 µl de inóculos crecientes de las distintas cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* partiendo de un inóculo inicial de 10⁶ UFC/ml y hasta el inóculo que consiguió el objetivo deseado, es decir una supervivencia del 100% de los animales infectados durante los 14 días de estudio con contaje bacteriano los primeros días post-infección. Para caracterizar los modelos no letales de neumonía experimental causada por las cepas de *P. aeruginosa* se usó mucina porcina (M-2378; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EE.UU.) en proporción 1:1 para poder conseguir dicho objetivo. Los inóculos se prepararon inmediatamente antes de la inoculación. Una vez que el animal estuvo anestesiado, se suspendió verticalmente con el cuello hiperextendido y se canalizó la tráquea del animal vía oral con una aguja metálica de punto roma conectada a una jeringa Hamilton que contenía el inóculo. Al finalizar, se mantuvo al animal durante aproximadamente 3 minutos en posición vertical para evitar que el inóculo pasase a la vía digestiva o al exterior, y posteriormente se colocaron en decúbito lateral a 30° hasta que se despertaron.

4.3. Estudios de supervivencia

Para caracterizar los modelos no letales, como ya se ha comentado anteriormente, perseguíamos una supervivencia de más de 14 días del 100% de los animales inoculados, con contaje bacteriano en pulmón los primeros días post-infección.

Se diferenció entre mortalidad relacionada con la técnica quirúrgica/anestesia (*exitus letalis* precoz) y la mortalidad relacionada con la neumonía (*exitus letalis*). Se definió muerte relacionada con la técnica quirúrgica/anestesia a la que se produjo en las primeras 4 horas desde la inoculación o durante la anestesia. Para confirmar el contaje bacteriano en pulmón y el hemocultivo positivo en sangre tras la infección, se eligieron y sacrificaron aleatoriamente (tiopental sódico al 5% por vía intraperitoneal) dos ratones en diferentes puntos temporales: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 y 30 días post-infección. Inmediatamente después, mediante técnica aséptica se procedió a la apertura torácica a la altura del esternón con tijeras y pinzas estériles. A continuación, se realizó una punción intracardiaca para exanguinar al animal y realizar después hemocultivos cualitativos (223). Para ello, la sangre extraída de cada animal se incubó durante 24 horas a 37 °C en 1 ml de medio MHB. Finalmente, con un asa estéril se sembraron 10 µl de cada uno de los tubos en placas de agar-sangre. Las placas se observaron tras 24 horas de incubación, expresándose el resultado como positivo (cuando había crecimiento bacteriano) o como negativo (cuando no había crecimiento bacteriano).

Tras la extracción de sangre, extrajimos de forma aséptica los pulmones y el corazón en bloque, procediéndose sobre una placa de petri estéril a la separación cuidadosa de los pulmones. El tejido pulmonar se procesó para conocer el número de UFC/g de tejido, y así confirmar la producción de infección. Para ello, los pulmones los pesamos en una balanza de precisión y a continuación se introdujeron en bolsas estériles con 2 ml de suero fisiológico estéril para su homogenización. Las bolsas se colocaron en un homogenizador (Stomacher Lab-Blender 80, Fisher Sc.) de tejidos durante 4 minutos a velocidad HIGH. Tras homogenizar las muestras se realizaron diluciones 1:100 en suero fisiológico estéril desde 10^{-2} a 10^{-6} , sembrándose 100 µl de dichas diluciones y del contenido de cada bolsa sin diluir (SD) en placas de agar-sangre. Las placas sembradas se incubaron 24 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo se realizó el recuento de colonias en las placas y se calculó el \log_{10} de UFC por gramo de tejido pulmonar (223).

Materiales y métodos

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{UFC/g} = \frac{\frac{\text{N}^\circ \text{ colonias (UFC)}}{\text{Vol. sembrado (ml)}} \times \frac{1}{\text{Dilución}} \times [\text{Volumen bolsa (ml)} + \text{peso (g)}]}{\text{Peso (g)}}$$

Si los cultivos fueron estériles se procedió a sembrar todo el material pulmonar y si el cultivo de éste también fue estéril se le asignó el valor del logaritmo correspondiente al nivel de sensibilidad del método (1 UFC en todo el residuo). Por tanto la sensibilidad del método fue:

$$\text{UFC/g} = \frac{1 \text{ colonia}}{\text{Volumen bolsa (ml)} + \text{peso (g)}}$$

4.4 Estudios histopatológicos

Para confirmar la neumonía en el animal, la mitad del tejido pulmonar de 9 ratones elegidos aleatoriamente, de los utilizados en la caracterización de los modelos de neumonía no letales, se fijaron usando formol, incluyéndose posteriormente en parafina y seccionándose mediante un micrótopo. Después se tiñeron mediante la técnica de hematoxilina/eosina, y se analizaron en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

5. Estudios de la respuesta celular innata y adaptativa en los modelos no letales de neumonía causada por cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina

Estos se realizaron usando los inóculos calculados en los estudios de caracterización para cada una de las cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. Además, un grupo de 6 ratones no infectados fueron estudiados como animales controles. En los siguientes puntos temporales: 30 minutos, 2, 4, 6, 24 y 48 horas post-infección, se sacrificaron 6 ratones (5 infectados + 1 control) mediante inyección i.p. de 0,2 ml de tiopental sódico al 5%.

Materiales y métodos

Inmediatamente después, a cada animal se le extrajeron asépticamente las siguientes muestras: Tejidos (bazo y pulmones); que se dividieron en dos fragmentos, uno para estudios cuantitativos, con la técnica descrita anteriormente en el apartado 4.3, y el otro para estudios celulares. Para los estudios celulares, el tejido, se pasó a través de un filtro de nylon de 70 μm (732-2758, BD *Biosciences*, CA) para preparar la suspensión celular. Después se lisaron los glóbulos rojos usando para ello NH_4Cl al 0,84% durante 5 minutos y tras estos, se centrifugaron a 1300 rpm durante 5 minutos a 4 °C.

Posteriormente, las células se limpiaron dos veces con DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) completo (centrifugación de 1300 rpm durante 3 minutos). Tras ello, se colocaron $2,5 \times 10^6$ células/ml por pocillo (placa de 96 pocillos fondo "U") y se resuspendieron en 100 μl de FACS buffer (PBS con suero fetal bovino (SFB) inactivado al 2% + NaN_3 al 0,1%) (2 veces). Tras ello, las células se resuspendieron en 200 μl de cóctel de superficie (tinción extracelular) usando: monocitos (anti-CD14 [Clon Sa14-2]), neutrófilos (anti-CD11b/BV711 [clon M1/70] + Ly6G/PE [Clon 1A8]), macrófagos (anti-F4/80/PE-CF594 [Clon T45-2342] + anti-CD11b/BV711 [Clon M1/70]). Una vez añadido el cóctel, se incubaron durante 30 minutos a 4°C protegidos de la luz. Tras esta incubación, se lavaron en FACS buffer (1300 rpm durante 3 minutos). Tras este lavado, se centrifugaron nuevamente resuspendiéndose en PBS. Tras este paso, se centrifugaron de la misma manera y se resuspendieron en 50 μl de Intrapep (A07803, *Beckman Coulter*) durante 15 minutos en hielo y protegidas de la luz. Tras este periodo de incubación, se lavaron (1300 rpm durante 3 minutos) con 100 μl de PBS. Finalmente, se lavaron las células centrifugándolas (1300 rpm durante 3 minutos) y resuspendiéndolas en FACS buffer (2 veces). Tras ello, las muestras se fijaron en FACS FIX (PBS con paraformaldehído al 1%) y guardaron protegidas de la luz y a 4 °C hasta su análisis por citometría de flujo ese mismo día.

Igualmente, de los animales se extrajo sangre mediante punción cardiaca, tras el sacrificio. Esta fue dividida igualmente en dos alícuotas, la primera para estudios cualitativos de bacteriemia, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Y la otra para estudios celulares. El protocolo es igual que el descrito para los estudios celulares con tejidos, pero sin filtrarla.

Para los estudios celulares de la respuesta inmune adaptativa, se siguió el mismo protocolo, excepto los marcadores celulares y los punto temporales. En este caso los

Materiales y métodos

marcadores usados para la tinción extracelular fueron los siguientes: linfocitos B (anti-CD19/BV421 [Clon 6D5]) y linfocitos T CD4 (anti-CD4/PE [Clon RM4-5]) y CD8 (anti-CD8/PE-Cy7 [Clon 53-6.7]); también que en este caso los puntos temporales analizados en los que se sacrificaron los ratones fueron: 1, 3, 7, 14, y 30 días post-infección.

6. Citometría de flujo

Una vez que tuvimos las muestras preparadas y fijadas con FACS FIX, se analizaron los datos mediante citometría de flujo, usando un citómetro FACS Canto II o LSR Fortessa (BD *Biosciences*) del Servicio de Citometría de Flujo y Separación Celular del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) y se analizaron con el software FlowJo (Treestar). Los porcentajes (%) de cada población celular estudiadas fueron determinados (224, 225).

7. Estudios de la respuesta inmune innata y adaptativa provocada por la mucina porcina

Al caracterizar los modelos no letales de neumonía experimental causados por las cepas de *P. aeruginosa* Pa 147 y Pa M1, fue necesario usar mucina porcina diluida al 5% en suero fisiológico estéril, por tanto añadimos un grupo control de animales inoculados sólo con esta mucina a los que les realizamos, estudios cuantitativos en tejido y sangre, estudios histopatológicos y estudios celulares. Para ello se siguieron los mismos protocolos y puntos temporales expuestos en los apartados anteriores, con la excepción de la n de animales usados que en este caso y para cumplir con la regla de las 3Rs (Reducir, Reutilizar y Reciclar) del uso de animal de experimentación (226) se redujo a 2 por punto horario.

7.1. Cuantificación de los niveles de Interleuquina 22 (IL-22) en tejido pulmonar

En los siguientes puntos temporales: 4, 6, 24 y 48 horas tras la infección, los siguientes grupos 5 ratones fueron sacrificados (tiopental sódico al 5%, i.p.):

1. Controles no inoculados.
2. Controles con mucina porcina (inoculados con mucina diluida en suero fisiológico estéril al 5%)

Materiales y métodos

3. Infectados con el inóculo del modelo no letal de neumonía con Pa 147
4. Infectados con el inóculo del modelo no letal de neumonía con Pa M1

Después, a cada animal se le extrajo asépticamente el tejido pulmonar, que se dividió en dos fragmentos. Uno para las determinaciones cuantitativas como en se ha descrito en el apartado 4.3, y el segundo para las determinaciones de IL-22 mediante técnica de ELISA. Para ello, las muestras se filtraron (70 µm de nylon) para preparar la suspensión celular y se lisaron los glóbulos rojos con NH₄Cl al 0,84% durante 5 minutos, tras esto se centrifugaron a 1300 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Después las células se lavaron dos veces con DMEM completo (1300 rpm, 3 min). El pellet se resuspendió en buffer de lisis celular (PBS 1X + 0,1 % Tritón 100X + inhibidor de proteasas 1:100) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó nuevamente (1300 rpm, 3 min) y nos quedamos con el sobrenadante. La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante el método Bradford utilizándose el reactivo *Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, para ello empleamos *Coomassie brilliant blue G-250* que interacciona con los aminoácidos básicos (especialmente arginina) y aromáticos de las proteínas, lo que provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante desde 465 a 595 nm. Es decir, la formulación roja del colorante cambia a la formulación azul cuando se une a la proteína. Para ello, las muestras se prepararon añadiendo a 5 µl de la misma, 795 µl de agua destilada y 200 µl *Protein assay*. Igualmente, se preparó un blanco (795 µl de agua destilada, 200 µl de *Protein Assay* y 5 µl del buffer de lisis celular donde se resuspendieron las muestras). La concentración obtenida se multiplicó por la dilución realizada con la muestra y las proteínas totales del pulmón se expresaron en µg/ml.

Los niveles de IL-22 se midieron utilizando un kit ELISA (*Murine IL-22 Mini ABTS ELISA Development Kit*, PeproTech, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estos datos se representaron como pg/mg de proteínas totales en el pulmón.

7.2. Estudios histopatológicos

En este caso queríamos comprobar si la mucina afectaba al tejido pulmonar ya sea a nivel de daño tisular o al nivel de reclutamiento de los PMN.

Materiales y métodos

La mitad del tejido pulmonar de 2 ratones de los grupos descritos en el apartado anterior fueron sacrificados (tiopental sódico al 5% i.p.) a las 4 horas post-infección, realizándose los estudios histopatológicos en el Departamento de Anatomía Patológica previamente descritos en el apartado 4.4.

7.3. Curvas de crecimiento

Para comprobar si la mucina porcina afectaba al crecimiento bacteriano de las cepas de *P. aeruginosa*, se realizaron curvas de crecimiento en diferentes medios y en presencia o ausencia de mucina gástrica porcina al 1%. Los medios con mucina porcina fueron esterilizados mediante autoclave de 121 °C durante 15 minutos (227).

Las condiciones estudiadas fueron:

- a) Control de esterilidad de cada uno de los medios usados
- b) Control de crecimiento en MHBII
- c) Control de crecimiento en MHBII + mucina porcina
- d) Control de crecimiento en medio mínimo M9
- e) Control de crecimiento en medio mínimo M9 + mucina porcina
- f) Control de crecimiento en medio mínimo M9 (suplementado con Mg^{+} 1M y Glucosa al 20%)
- g) Control de crecimiento en medio mínimo M9 (suplementado con Mg^{+} 1M y Glucosa al 20%) + mucina porcina

A todas estas condiciones, excepto a los CE, se le añadió la concentración bacteriana deseada, obteniéndose un volumen final de 10 ml. Para ello, se cogieron colonias frescas recuperadas de placas de agar-sangre, se resuspendieron en 20 ml de MHB e incubaron durante 18-20 horas en agitación a 37 °C en aerobiosis. El inóculo se ajustó a 0,5 McFarland (1×10^8 UFC/ml), y se realizó la dilución correspondiente para añadir una concentración bacteriana final de 5×10^5 UFC/ml. Se determinó el número de UFC/ml a todas las condiciones tanto al comienzo del ensayo (0 horas) como a las 2, 4, 8 y 24 horas, del inicio del mismo. En cada punto temporal se sembraron en placas de agar-

Materiales y métodos

sangre 100 μ L de las siguientes diluciones seriadas: SD, 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} . Estas placas se incubaron en aerobiosis a 37°C y sin atmósfera de CO₂ durante 24 horas, momento en el que se realizó el recuento de UFC/ml. Este ensayo se realizó por duplicado.

8. Estudios de eficacia de las células de memoria en modelos letales experimentales de neumonía causada por cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, con diferentes patrones de resistencia a colistina

8.1. Caracterización de los modelos murinos letales de neumonía

Para los estudios de eficacia con células de memoria se caracterizaron modelos letales de neumonía experimental con las cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa* usadas en este trabajo. Para ello, se realizaron modificaciones a los modelos de neumonía previamente usados en nuestro grupo (223). Brevemente, se inocularon intratraquealmente grupos de 6 ratones C57BL/6J previamente anestesiados, con concentraciones bacterianas crecientes de cada una de las cepas, hasta obtener la dosis mínima letal (DML) de cada una de ellas. La DML es la concentración mínima bacteriana que causa una mortalidad del 100% de los animales. Las técnicas de anestesia e inoculación se realizaron con el mismo protocolo descrito en el apartado 4.2.

8.2. Aislamiento de linfocitos CD8+ y CD19+ de memoria

Para aislar las células de memoria, dependiendo de los linfocitos que se querían recuperar, se infectaron 12 ratones machos C57BL/6J con los inóculos caracterizados para los modelos de neumonía no letal de cada cepa. Pasadas 6 semanas de esta inoculación, los animales se sacrificaron mediante una inyección i.p. de 0,2 ml de tiopental sódico al 5% y se les extrajo el bazo para preparar las suspensiones celulares (protocolo descrito en el apartado 5). En el caso de la neumonía experimental causada por cepas de *A. baumannii*, aislamos linfocitos CD8+ de memoria; sin embargo, en el caso de la causada por las cepas de *P. aeruginosa* se aislaron linfocitos B (CD19+) de memoria. Para aislar estas células se utilizó la técnica de selección positiva mediante *autoMAC Pro Separator* (REF: 130-117-044; MACS, *Mytenyi Biotec*, CD8a (Ly2) *Microbeads mouse* y REF: 130-121-301; MACS, *Mytenyi Biotec*, CD19 *Microbeads mouse*), utilizándose el protocolo descrito por la casa comercial (Fig. 9). Para ello, se determinó el número de células y se centrifugó la muestra (1300 rpm 5min), el pellet se resuspendió en 90 μ l de tampón (PBS, pH 7,2, albúmina de suero bovino al 0,5% (BSA)

Materiales y métodos

y EDTA 2 mM) y 10 μ l de las microbeads correspondientes en cada caso por cada 10^7 células totales. Después se mezcló bien y se incubó durante 10 minutos en frío. Posteriormente se procedió a la separación celular. Tras aislar las células del bazo, se contaron y 100 μ l de la suspensión celular se tiñeron con los marcadores extracelulares correspondientes. Los linfocitos CD8⁺ con anti-CD44^{hi}/APC [Clon IM7] y anti-CD8/PE-Cy7 [Clon 53-6.7], y los linfocitos CD19⁺ con anti-CD273/PE [Clon TY25], anti-CD80/APC [Clon 16-10A1], anti-IgD/FITC [Clon 11-26c.2a] y anti-CD19/BV421 [Clon 6D5]. Tras ello, independientemente del tipo de célula que nos interesase, seguimos el mismo protocolo utilizado para los análisis por citometría de flujo descritos en el apartado 6.

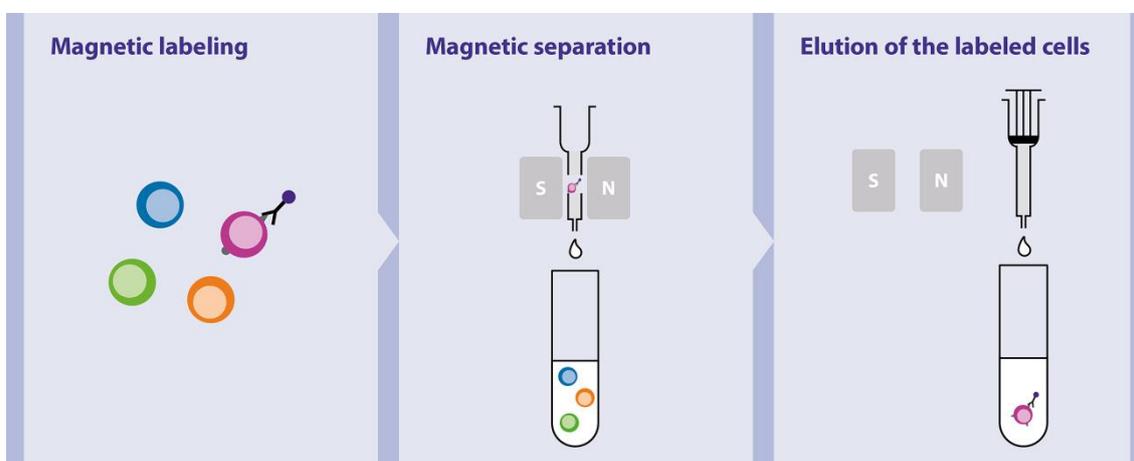


Figura 9. Separación de células mediante selección positiva por *autoMAC Pro Separator* (<https://www.miltenyibiotec.com/US-en/products/mac-cell-separation/cell-separation-reagents/straightfrom-microbeads/straightfrom-whole-blood-microbeads.html>)

8.3. Evaluación de la eficacia del tratamiento con linfocitos CD8⁺ de memoria en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de *A. baumannii*, con diferente patrón de resistencia a colistina.

8.3.1. Grupos de animales de experimentación

Para los estudios de eficacia del tratamiento en las infecciones causadas por las cepas multirresistentes AbCS01 y AbCR17 de *A. baumannii* se utilizaron un total de 102 ratones de entre 16-20 g de peso que se distribuyeron en los siguientes grupos:

Materiales y métodos

- 1) Controles, no tratados.
- 2) Linfocitos CD8+ de memoria, 2×10^6 células/ intravenosa (iv).
- 3) Sulbactam 240 mg/Kg/día/ intramuscular (im).
- 4) Tigeciclina 10 mg/Kg/día/ subcutánea (sc).

Tras la inoculación de los ratones para inducirles una neumonía con las cepas Ab CS01 y Ab CR17 se comenzaron los tratamientos para evaluar la eficacia de los linfocitos CD8+ de memoria. El tratamiento con las células de memoria se inició a los 30 minutos después de la inoculación para evitar la mortalidad precoz que se produce en los grupos controles, en una única dosis intravenosa. Las dosis de los antimicrobianos (tigeciclina y sulbactam) se ajustaron a los estudios de farmacocinéticas/farmacodinámicos previamente caracterizados en nuestro grupo. El tratamiento con tigeciclina comenzó a la hora de la infección mientras que con sulbactam comenzó a las 4 horas de la misma. Las dosis se administraron para tigeciclina por vía sc y para sulbactam por vía im. El tratamiento de los antimicrobianos se administró en dos dosis al día en el caso de tigeciclina y tres dosis al día para sulbactam durante el mismo periodo de 72 horas de tratamiento.

8.3.2. Grupos de toxicidad

Para el control de la toxicidad tanto de las células de memoria como de los antimicrobianos se evaluaron todos los tratamientos que se iban a usar en los estudios de eficacia, en grupos de 5 ratones sin inocular durante un período de 72 horas, y a las dosis descritas para cada grupo de tratamiento.

8.3.3. Grupos para estudios histopatológicos

Grupos de 5 ratones se inocularon con cada una de las 2 cepas de *A. baumannii* en estudio, para comprobar la producción de la neumonía experimental y estudiar la celularidad en el tejido pulmonar. Para ello los pulmones sin homogeneizar se fijaron usando formol, incluyéndose posteriormente en parafina y seccionándose mediante un microtomo, realizándose después las tinciones rutinarias de hematoxilina/eosina, de la misma manera que se ha descrito en el apartado 4.4.

8.3.4. Evaluación del efecto del tratamiento:

Monitorización de la supervivencia y sacrificio de los animales

En los grupos control se monitorizó la supervivencia durante las primeras 72 horas. Se diferenció entre mortalidad relacionada con la técnica quirúrgica/anestesia (*exitus letalis* precoz) y mortalidad relacionada con la neumonía (*exitus letalis*). Se definió muerte relacionada con la técnica quirúrgica/anestesia a la que acaeció en las primeras 4 horas desde la inoculación, o durante la misma.

Posteriormente, los ratones fueron tratados y monitorizados durante 72 horas. Después de la muerte o sacrificio de los ratones a las 72 horas, mediante una inyección de 0,2 ml de tiopental sódico, se obtuvieron asépticamente muestras de pulmón y sangre y se procesaron para cultivos cuantitativos (\log_{10} UFC/g) en placas de agar-sangre siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.3. Brevemente, las muestras de pulmones se pesaron y homogeneizaron en suero fisiológico estéril para el recuento cuantitativo. También se obtuvieron muestras de sangre para hemocultivos cualitativos; los resultados se expresaron como positivo (1 UFC presente en la placa) o negativo y cultivo cuantitativo (\log_{10} UFC/ml) en placas de agar sangre (12).

8.4. Evaluación de la eficacia del tratamiento con linfocitos CD19+ de memoria en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina

8.4.1. Grupos de animales de experimentación

Para los estudios de eficacia del tratamiento en las infecciones causadas por las cepas multirresistentes Pa 147 y Pa M1 de *P. aeruginosa* se utilizaron un total de 99 ratones, de entre 16-20 g de peso que se distribuyeron en los siguientes grupos:

- 1) Controles, no tratados.
- 2) Linfocitos B de memoria, 2×10^6 células/iv.
- 3) Ceftazidima 200 mg/Kg/día/ip.
- 4) Colistina 60 mg/Kg/día/ip.

Materiales y métodos

Tras la inoculación de los ratones para inducirles una neumonía con las cepas Pa 147 y Pa M1 se comenzaron los tratamientos para evaluar la eficacia de los linfocitos B de memoria. El tratamiento con las células de memoria se inició a los 30 minutos de la inoculación, en una única dosis intravenosa. Las dosis de los antimicrobianos (ceftazidima y colistina) se ajustaron a los estudios de farmacocinéticas/farmacodinámicos previamente caracterizados en nuestro grupo. El tratamiento con ceftazidima y colistina comenzó a las 4 horas de la infección. Las dosis se administraron por vía ip tanto para ceftazidima como para colistina. El tratamiento de los antimicrobianos se administró en dos dosis al día en el caso de ceftazidima y tres dosis al día para colistina durante el mismo periodo de 72 horas de tratamiento.

Se realizaron estudios de toxicidad, grupos de animales para estudios histopatológicos, y se evaluó el efecto del tratamiento (monitorización de la supervivencia y sacrificio de los animales) de la misma manera que se ha descrito en los apartados 8.3.2, 8.3.3 y 8.3.4.

9. Evaluación de la eficacia del tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas en IgM en monoterapia y en combinación con antimicrobianos en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina

9.1.1 Grupos de animales de experimentación

Para los estudios de eficacia del tratamiento en las infecciones causadas por las cepas Pa 147 y Pa M1 de *P. aeruginosa* se utilizaron un total de 137 ratones, de entre 16-20 g de peso que se distribuyeron en los siguientes grupos:

- 1) Controles, no tratados.
- 2) IgIV enriquecidas en IgM 430 mg/kg/día/iv.
- 3) Ceftazidima 200 mg/kg/día/ip.
- 4) Colistina 60 mg/kg/día/ip.
- 5) IgIV enriquecidas en IgM 430 mg/kg/día/iv + Colistina 60 mg/kg/día/ip.
- 6) IgIV enriquecidas en IgM 430 mg/kg/día/iv + Ceftazidima 200 mg/kg/día/ip.

Materiales y métodos

El tratamiento con IgIV enriquecidas en IgM se comenzó a los 30 minutos post-infección, el de colistina y ceftazidima se comenzaron 4 horas post-infección como ya se ha comentado en el apartado anterior. Las dosis se administraron para las IgIV enriquecidas en IgM por vía iv y para colistina y ceftazidima por vía ip. El tratamiento se administró en una única dosis el primer día de la inoculación para IgIV enriquecidas en IgM, dos dosis al día para la ceftazidima y tres dosis al día para la colistina. Para las combinaciones la hora de comenzar cada tratamiento y las dosis fueron las mismas que cada uno en monoterapia.

Posteriormente, los ratones fueron tratados y monitorizados durante 72 horas. Después de la muerte o sacrificio de los ratones a las 72 horas (tiopental), se obtuvieron asépticamente muestras de pulmón y sangre y se procesaron de la misma manera que se ha descrito en el apartado 8.3.4. También se realizaron estudios de toxicidad e histopatológicos de la misma manera que se han descrito en los apartados 8.3.2 y 8.3.3.

10. Análisis estadísticos

Las variables cuantitativas referentes a los diferentes grupos (Log_{10} UFC/g de tejido pulmonar y log_{10} UFC/ml sangre) se expresaron con la media aritmética como medida central y la desviación estándar como medida de dispersión. Las variables cualitativas (mortalidad, hemocultivos estériles) se expresaron en porcentajes.

El tamaño de los grupos de tratamiento se estableció para detectar una diferencia de 1,5 log_{10} UFC/g con un error alfa de 0,05 y un error beta de 0,20.

Los análisis de la respuesta inmune (innata y adaptativa) y los resultados del Kit de ELISA para IL-22 (Capítulo 1) se llevaron a cabo mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov para la prueba de normalidad. La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Los cálculos se llevaron a cabo con ayuda del software GraphPadPrism versión 6. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo.

La comparación entre los grupos de eficacia de tratamiento (Capítulos 2 y 3) se realizaron mediante el test exacto de Fisher, análisis de varianzas (ANOVA) y los test de comparaciones múltiples post-hoc de Dunnet y de Tukey. Los cálculos se llevaron a

Materiales y métodos

cabo con ayuda del paquete estadístico SPSS versión 22.0. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Resultados

CAPÍTULO 1: Respuesta inmune celular frente a modelos no letales de neumonía experimental causada por multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina

1. Estudios *in vitro*

1.1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Las CMIs de las cepas clínicas multirresistentes Ab CS01 y Ab CR17 de *A. baumannii* y de las cepas Pa 147 y P aM1 de *P. aeruginosa* utilizadas se muestran en la Tabla 1 y 2.

Tabla 1. Sensibilidad *in vitro* de las cepas de *A. baumannii* utilizadas en el estudio.

Cepas Antimicrobianos	Ab CS01		Ab CR17	
	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	CMB ($\mu\text{g/ml}$)
Cefepima	32	64	8	32
Ceftazidima	64	128	64	128
Meropenem	64	128	>256	>256
Ticarcilina	>256	>256	>256	>256
Sulbactam	4	8	2	4
Amikacina	1	2	1	1
Gentamicina	2	2	$\leq 0,5$	0,5
Ciprofloxacino	32	32	16	32
Colistina	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	64	128
Tigeciclina	$\leq 0,5$	2	4	8

Ab CS01 y Ab CR17 fueron sensibles a amikacina (sensible si CMI $\leq 8 \mu\text{g/ml}$, resistente si CMI $> 16 \mu\text{g/ml}$), gentamicina (sensible si CMI $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, resistente si CMI $> 4 \mu\text{g/ml}$) y sulbactam (sensible si CMI $\leq 4 \mu\text{g/ml}$, intermedia si CMI = $8 \mu\text{g/ml}$, resistente si CMI $\geq 16 \mu\text{g/ml}$) y resistentes a ceftazidima (sensible si CMI $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, intermedia si CMI = $2 \mu\text{g/ml}$, resistente si CMI $\geq 4 \mu\text{g/ml}$), ciprofloxacino (sensible si CMI $\leq 1 \mu\text{g/ml}$, resistente si CMI $> 1 \mu\text{g/ml}$), meropenem (sensible si CMI $\leq 2 \mu\text{g/ml}$,

Resultados

resistente si CMI > 8 µg/ml) y ticarcilina (sensible si CMI ≤ 16 µg/ml, intermedia si CMI = 32µg/ml, resistente si CMI ≥ 128 µg/ml) . Sin embargo, Ab CS01 fue resistente a cefepima (sensible si CMI ≤ 8 µg/ml, intermedia si CMI = 16 µg/ml, resistente si CMI ≥ 32 µg/ml), mientras que Ab CR17 fue sensible a este.

Tabla 2. Sensibilidad *in vitro* de las cepas de *P. aeruginosa* utilizadas en el estudio.

Cepas Antimicrobianos	Pa 147		Pa M1	
	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)
Cefepima	8	16	2	32
Ceftazidima	8	32	≤0,25	2
Meropenem	>128	>128	0,25	2
Ticarcilina	32	64	1	32
Sulbactam	>128	>128	128	>128
Amikacina	1	2	4	16
Gentamicina	>128	>128	1	2
Ciprofloxacino	32	64	1	2
Colistina	0,5	4	>128	>128
Tigeciclina	4	8	4	8

Pa 147 y Pa M1, fueron sensibles a amikacina (sensible si CMI ≤ 8 µg/ml, resistente si CMI > 16 µg/ml), ceftazidima y cefepima (sensible si CMI ≤ 8 µg/ml, resistente si CMI > 8 µg/ml) y resistentes a ciprofloxacino (sensible si CMI ≤ 0,5 µg/ml, resistente si CMI > 0,5 µg/ml). Sin embargo, Pa 147 fue resistente a gentamicina (sensible si CMI ≤ 4µg/ml, resistente si CMI > 4 µg/ml), meropenem (sensible si CMI ≤ 2 µg/ml, resistente si CMI > 8 µg/ml) y ticarcilina (sensible si CMI ≤ 16 µg/ml, resistente si CMI > 16 µg/ml), mientras que Pa M1 fue sensible a estos.

Resultados

2. Caracterización de modelos murinos no letales de neumonía

2.1. Neumonía murina no letal causada por cepas de *A. baumannii* con diferente patrón de resistencia a colistina

Los inóculos que permitieron la supervivencia del 100% de los animales inoculados fueron 8,41 y 8,98 log₁₀ UFC/mL para Ab CS01 y Ab CR17, respectivamente. El recuento bacteriano y el % de bacteriemia, se muestran en las tablas 3 y 4 para ambas cepas.

Los estudios histopatológicos confirmaron la neumonía experimental con estos inóculos en ambas cepas.

Para la cepa Ab CS01 el conteo bacteriano en pulmón tuvo un descenso significativo (4 log₁₀ UFC/g) entre el día primero y segundo post-infección. Todos los animales sobrevivieron a la inoculación.

Para la cepa Ab CR17 el conteo bacteriano en pulmón tuvo su mayor descenso (2,3 log₁₀ UFC/g) entre las 4 horas y día primero post-infección. Todos los animales sobrevivieron a la inoculación.

2.2. Neumonía murina no letal causada por cepas de *P. aeruginosa* con diferente patrón de resistencia a colistina.

Los inóculos que permitieron la supervivencia del 100% de los animales inoculados fueron 6,85 y 9,07 log₁₀ UFC/mL para Pa 147 y Pa M1, respectivamente. El recuento bacteriano y el % de bacteriemia, se muestran en las tablas 5 y 6 para ambas cepas.

Los estudios histopatológicos confirmaron la neumonía experimental con estos inóculos en ambas cepas.

Para la cepa Pa 147 el conteo bacteriano en pulmón tuvo su mayor descenso (2,3 log₁₀ UFC/g) entre los días primero y segundo post-infección. Todos los animales sobrevivieron a la inoculación.

Para la cepa Pa M1 el conteo bacteriano en pulmón tuvo su mayor descenso (2,6 log₁₀ UFC/g) entre los días segundo y tercero post-infección. Todos los animales sobrevivieron a la inoculación.

Tabla 3. Recuento bacteriano en pulmón (Log_{10} UFC/g) y bacteriemia (%) en la neumonía murina no letal causada por Ab CS01.

	Horas	Días								
	4	1	2	3	4	5	6	7	9	14
Log_{10} UFC/g	8,5 ± 0,5	7,0 ± 0,2	3,0 ± 0,2	2,0 ± 0,3	2,1 ± 0,8	1,8 ± 0,5	1,6 ± 2,1	2,1 ± 0,2	1,1 ± 0,9	1,6 ± 0,2
%	100	50	0	0	0	50	0	100	0	0

Tabla 4. Recuento bacteriano en pulmón (Log_{10} UFC/g) y bacteriemia (%) en la neumonía murina no letal causada por Ab CR17.

	Horas	Días								
	4	1	2	3	4	5	6	7	9	14
Log_{10} UFC/ml	6,7 ± 0,5	4,3 ± 1,5	3,2 ± 0,3	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,3	0,9 ± 1,3	1,2 ± 1,6	0,9 ± 1,3	1,1 ± 1,7	0,0 ± 0,0
%	100	50	100	100	100	100	100	0	50	0

Tabla 5. Recuento bacteriano (Log_{10} UFC/g) en pulmón y bacteriemia (%) en la neumonía murina no letal causada por Pa 147.

	Horas	Días								
	4	1	2	3	4	5	6	7	9	14
Log_{10} UFC/g	5,6 ± 0,2	4,8 ± 1,6	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,7	1,6 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
%	0	0	50	50	0	0	0	0	0	0

Tabla 6. Recuento bacteriano en pulmón (Log_{10} UFC/g) y bacteriemia (%) en la neumonía murina no letal causada por Pa M1.

	Horas	Días								
	4	1	2	3	4	5	6	7	9	14
Log_{10} UFC/ml	6,8 ± 0,0	5,2 ± 0,3	6,9 ± 1,4	4,3 ± 0,1	3,7 ± 0,0	3,2 ± 0,4	0,9 ± 1,3	3,4 ± 0,0	2,7 ± 0,0	2,4 ± 0,6
%	0									

Resultados

3. Respuesta celular innata y adaptativa en los modelos no letales causada por cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina

3.1 Respuesta celular innata frente a cepas de *A. baumannii* con diferentes patrones de resistencia a colistina

La respuesta celular innata en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CS01 se muestra en la figura 10.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos disminuyó a las 2h y 6h ($P<0,01$ y $P<0,05$, respectivamente). En cuanto al porcentaje de neutrófilos, aumento desde los 30 minutos ($P<0,001$), seguido de una disminución a las 2h ($P<0,05$), y con un nuevo aumento desde las 24h ($P<0,001$). Finalmente, en cuanto al porcentaje de monocitos, no existieron importantes cambios, encontrándose una disminución a las 6h ($P<0,01$).

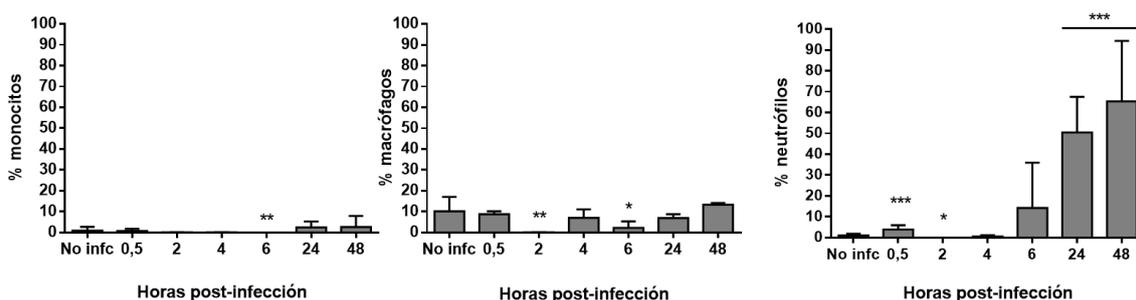


Figura 10. Respuesta celular innata en pulmón en animales infectados con Ab CS01 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ y *** $P<0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular innata en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CS01 se muestra en la figura 11.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos disminuyó a las 2h y 4h ($P<0,01$ y $P<0,05$, respectivamente), seguido por un aumento desde las 24h ($P<0,05$). En cuanto al porcentaje de neutrófilos aumentó desde las 24h ($P<0,01$). Finalmente, el porcentaje de monocitos disminuyó a las 2h y 6h ($P<0,01$).

Resultados

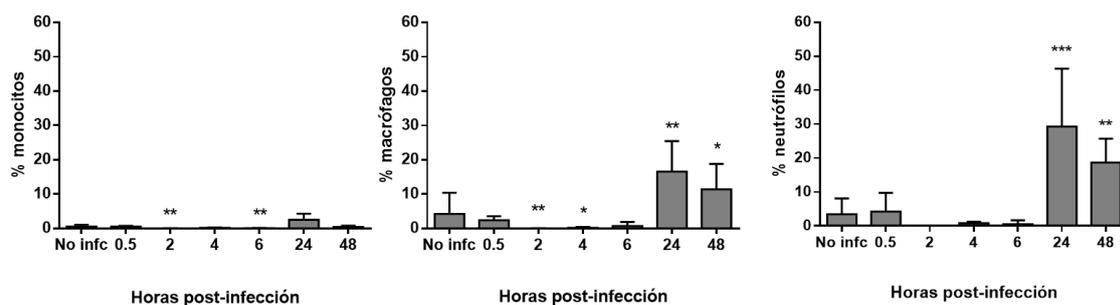


Figura 11. Respuesta celular innata en sangre en animales infectados con Ab CS01 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular innata en **bazo** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CS01 se muestra en la figura 12.

Con respecto a animales no infectados el porcentaje de macrófagos disminuyó a las 6h post-infección ($P < 0,05$) seguido de un aumento desde las 24h. Igualmente, el porcentaje de neutrófilos disminuyó desde los 30 minutos a las 4 horas ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente), seguido de un importante aumento desde las 24h ($P < 0,05$). Finalmente, no se observó variación en la cinética de la población de monocitos.

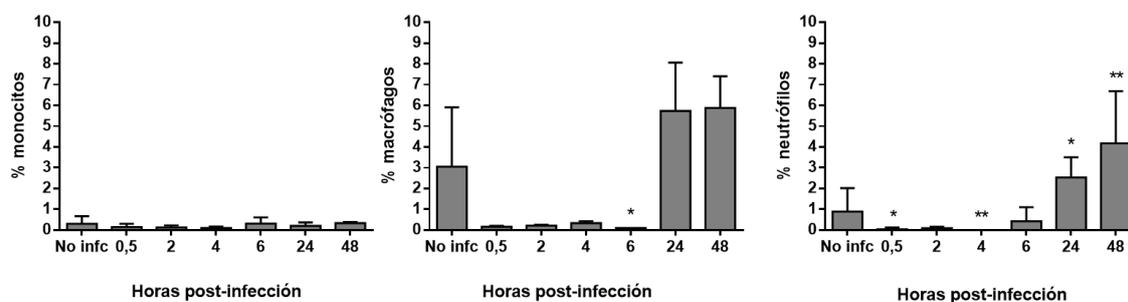


Figura 12. Respuesta celular innata en bazo en animales infectados con Ab CS01 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ comparado con animales no infc.

Resultados

La respuesta celular innata en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CR17 se muestra en la figura 13.

Con respecto a animales no infectados, no se observaron variaciones en la cinética de la población de macrófagos con respecto a animales no infectados. En cuanto al porcentaje de neutrófilos aumentó desde los 30 minutos ($P<0,01$). Finalmente, el porcentaje de monocitos disminuyó a las 6h ($P<0,05$).

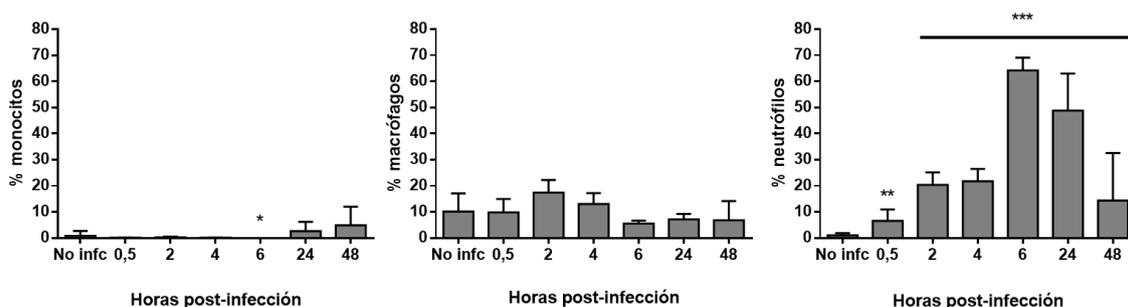


Figura 13. Respuesta celular innata en pulmón en animales infectados con Ab CR17 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ y *** $P<0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular innata en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CR17 se muestra en la figura 14.

Con respecto a animales no infectados no se observaron variaciones en la cinética de la población de macrófagos. En cuanto al porcentaje de neutrófilos aumentó a las 24h ($P<0,05$). Finalmente, el porcentaje de monocitos disminuyó a los 30 minutos y 6h ($P<0,05$).

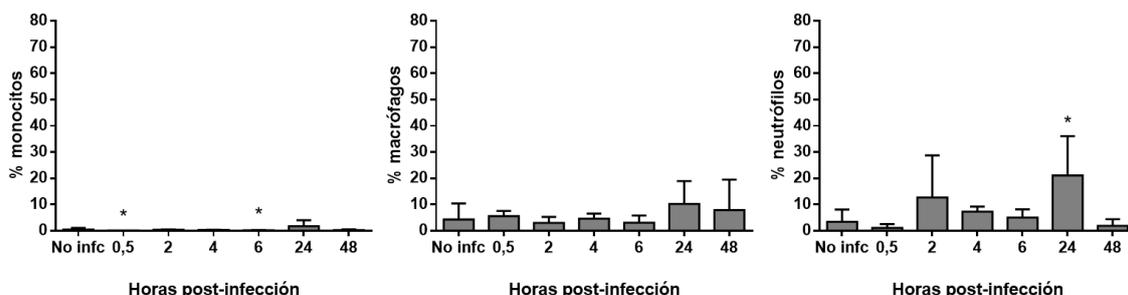


Figura 14. Respuesta celular innata en sangre en animales infectados con Ab CR17 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos

Resultados

y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ comparado con los animales no infc.

La respuesta celular innata en **bazo** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CR17 se muestra en la figura 15.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos aumentó desde los 30 minutos a las 2h ($P < 0,01$ y $P < 0,05$, respectivamente). En cuanto al porcentaje de neutrófilos aumentó desde los 30 minutos a las 2h ($P < 0,001$) y desde las 6h a las 24h ($P < 0,05$). Finalmente, no se observó variación en la cinética de la población de monocitos.

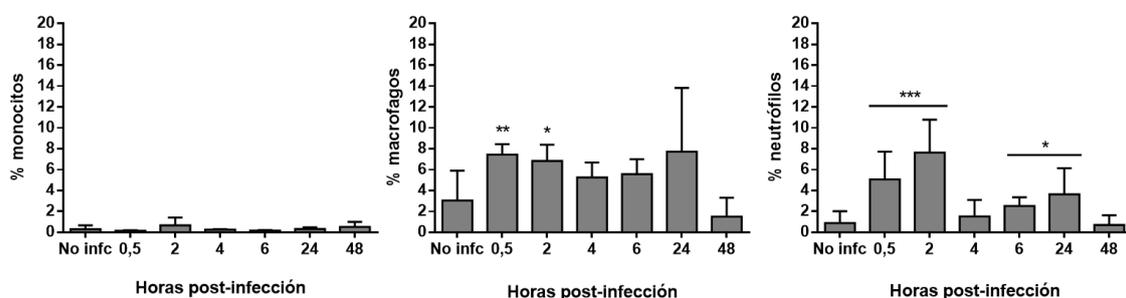


Figura 15. Respuesta celular innata en bazo en animales infectados con Ab CR17 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ comparado con animales no infc.

3.2. Respuesta celular adaptativa frente a cepas de *A. baumannii* con diferente patrón de resistencia a colistina.

La respuesta celular adaptativa en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CS01 se muestra en la figura 16.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó desde el día 1 al día 3 ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente) y el día 30 ($P < 0,05$). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8, ambos disminuyeron los días 1 ($P < 0,01$ y $P < 0,001$, respectivamente) y 3 ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente).

Resultados

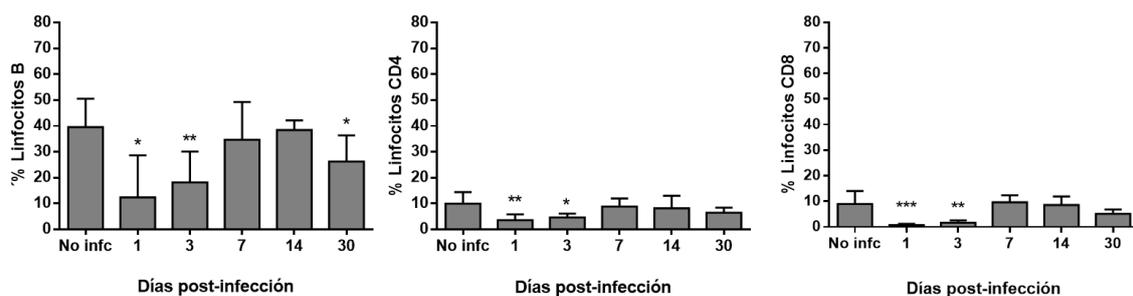


Figura 16. Respuesta celular adaptativa en pulmón en animales infectados con Ab CS01 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular adaptativa en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CS01 se muestra en la figura 17.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó los días 1 y 7 ($P < 0,001$ y $P < 0,05$, respectivamente). En cuanto a los porcentajes de linfocitos T CD4 y CD8, se mantuvieron estables durante todo el tiempo de estudio, a excepción de un aumento en los CD8 el día 30 ($P < 0,05$).

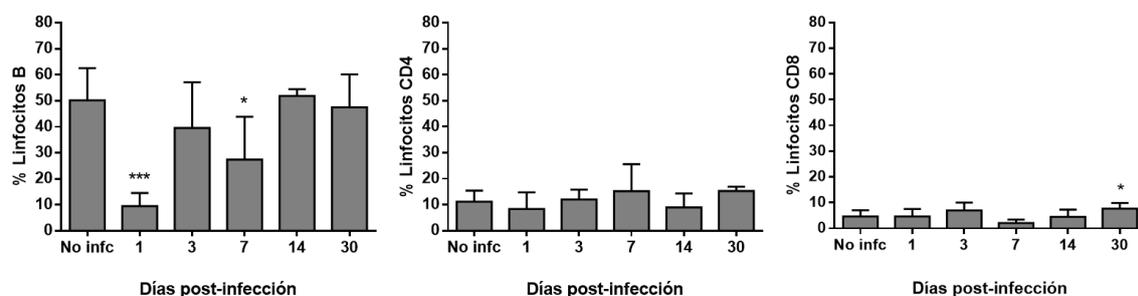


Figura 17. Respuesta celular adaptativa en sangre en animales infectados con Ab CS01 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular adaptativa en **bazo** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CS01 se muestra en la figura 18.

Resultados

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B aumentó el día 14 ($P < 0,05$). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 disminuyó desde el día 7 al día 14 ($P < 0,05$). Finalmente, al igual que en sangre, el porcentaje de linfocitos T CD8 se mantuvieron estables durante todo el tiempo de estudio, a excepción de un aumento en el día 30 ($P < 0,05$).

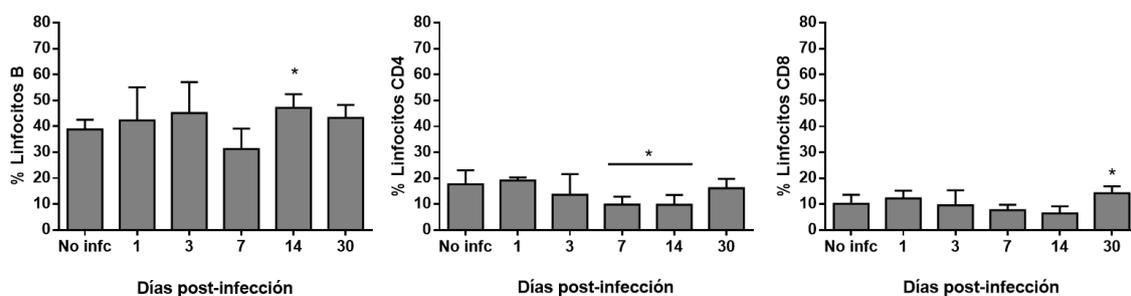


Figura 18. Respuesta celular adaptativa en bazo en animales infectados con Ab CS01 y animales no infectados. Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular adaptativa en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CR17 se muestra en la figura 19.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó los días 1, 7 y 30 ($P < 0,01$). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 disminuyó el día 3 ($P < 0,01$) y aumentó el día 14 ($P < 0,01$). Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD8 disminuyó desde el día 3 al día 7 ($P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente)

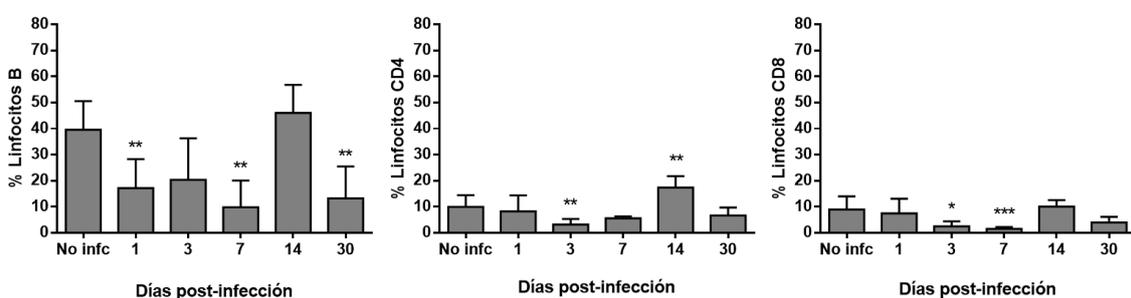


Figura 19. Respuesta celular adaptativa en pulmón en animales infectados con Ab CR17 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada

Resultados

punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular adaptativa en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CR17 se muestra en la figura 20.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó los días 1 ($P < 0,05$) y 14 ($P < 0,01$). En cuanto a los porcentajes de linfocitos T CD4 y CD8 se mantuvieron estables durante todo el tiempo de estudio.

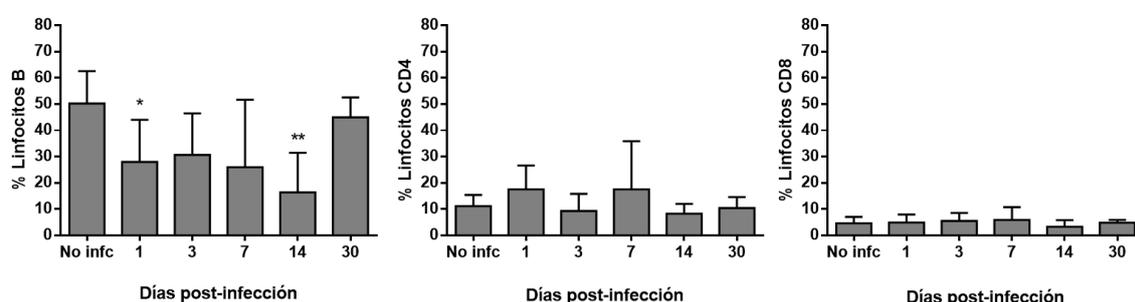


Figura 20. Respuesta celular adaptativa en sangre en animales infectados con Ab CR17 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular adaptativa en **bazo** frente a la neumonía experimental no letal causada por Ab CR17 se muestra en la figura 21.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B aumentó el día 3 ($P < 0,01$) seguido de una disminución desde el día 7 al 14 ($P < 0,01$). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 disminuyó desde el día 7 ($P < 0,05$). Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD8 aumentó el día 1 ($P < 0,05$) y disminuyó desde el día 7 al 14 ($P < 0,001$ y $PP < 0,01$, respectivamente).

Resultados

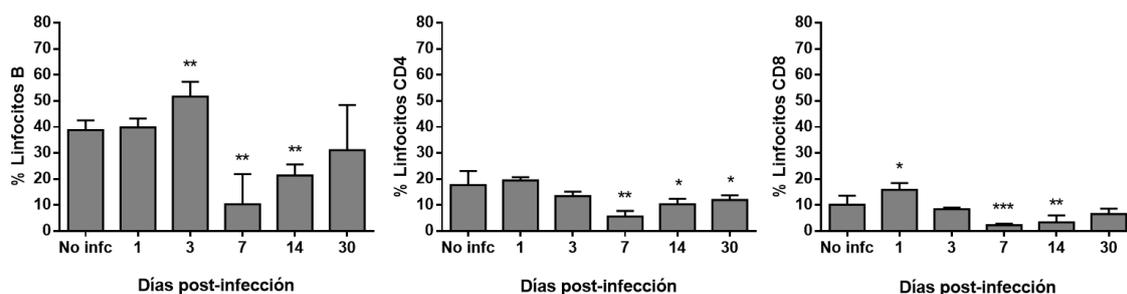


Figura 21. Respuesta celular adaptativa en bazo en animales infectados con Ab CR17 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ comparado con animales no infc.

3.3. Respuesta celular innata frente a cepas de *P. aeruginosa* con diferente patrón de resistencia a colistina.

La respuesta celular innata en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa 147 se muestra en la figura 22.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos disminuyó desde los 30 minutos a las 2h ($P < 0,05$) y de nuevo a las 6h ($P < 0,05$). En cuanto al porcentaje de neutrófilos aumentó a las 4h ($P < 0,01$) y desde las 24h ($P < 0,01$). Finalmente, el porcentaje de monocitos disminuyó desde los 30 minutos a las 2h ($P < 0,05$) y desde las 6h a las 24h ($P < 0,05$) con un aumento a las 48h ($P < 0,01$).

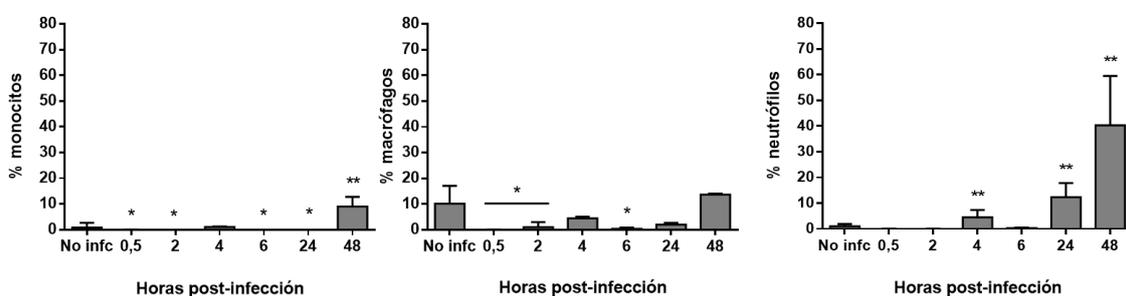


Figura 22. Respuesta celular innata en pulmón en animales infectados con Pa 147 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ comparado con animales no infectados infc.

Resultados

La respuesta celular innata en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa 147 se muestran en la figura 23.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos disminuyó a los 30 minutos y a las 6h ($P<0,01$ y $P<0,05$ respectivamente). En cuanto al porcentaje de neutrófilos no se observó variación significativa en la cinética de la población. Finalmente, el porcentaje de monocitos disminuyó desde los 30 minutos a las 2h ($P<0,05$ y $P<0,01$, respectivamente) y desde las 6h a las 24h ($P<0,05$).

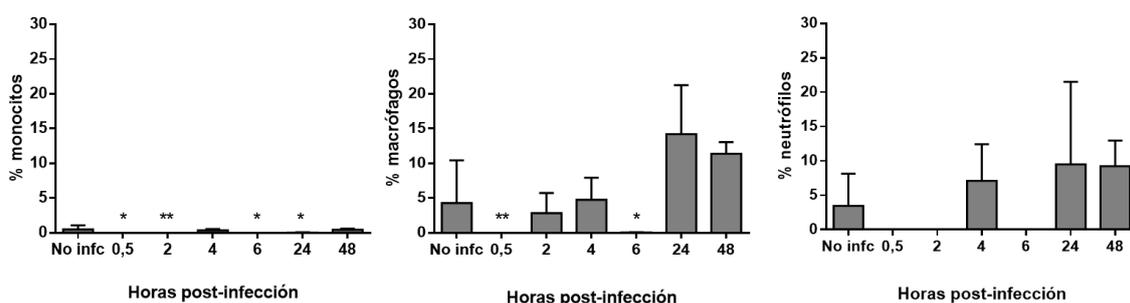


Figura 23. Respuesta celular innata en sangre en animales infectados con Pa 147 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P<0,05$ y ** $P<0,01$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular innata en **bazo** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa 147 se muestra en la figura 24.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos desde los 30 minutos a las 2h ($P<0,05$) y a las 6h ($P<0,05$). En cuanto al porcentaje de neutrófilos disminuyó a los 30 minutos y a las 6h ($P<0,05$). Finalmente, el porcentaje de monocitos disminuyó a las 2h y a las 6h ($P<0,05$ y $P<0,01$, respectivamente).

Resultados

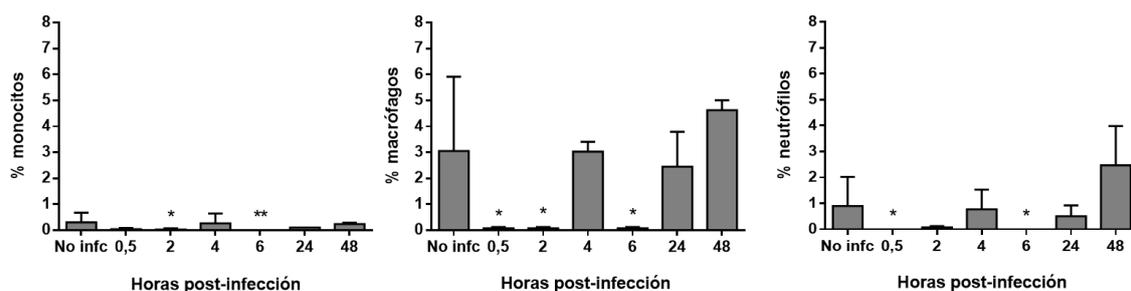


Figura 24. Respuesta celular innata en bazo en animales infectados con Pa 147 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular innata en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa M1 se muestran en la figura 25.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos disminuyó a los 30 minutos y a las 4h ($P < 0,05$ y $P < 0,01$, respectivamente). En cuanto al porcentaje de neutrófilos aumentó a las a las 2h ($P < 0,01$), seguido por una disminución a las 4h ($P < 0,05$) y con un nuevo aumento desde las 24h ($P < 0,01$). Finalmente, no se observó variación en la cinética de la población de monocitos.

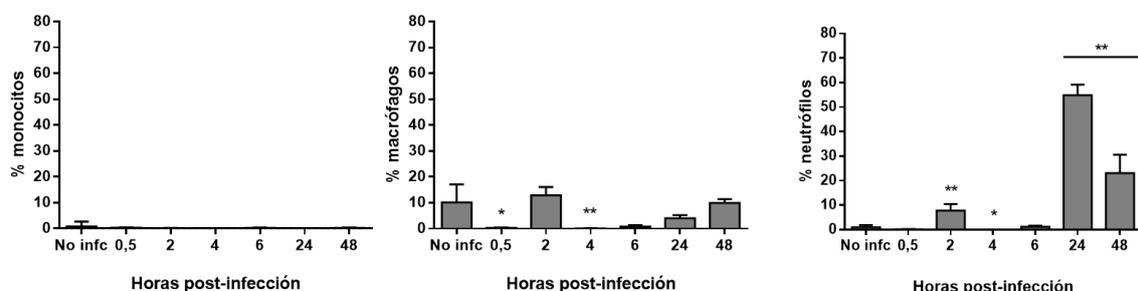


Figura 25. Respuesta celular innata en pulmón en animales infectados con Pa M1 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de $n=5$ ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular innata en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa M1 se muestra en la figura 26.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos disminuyó a las 4h ($P < 0,05$) y aumentó a las 48h ($P < 0,05$). En cuanto al porcentaje de neutrófilos aumentó

Resultados

a las 2h y a las 24h ($P<0,05$). Finalmente, el porcentaje de monocitos disminuyó desde las 4h a las 6h ($P<0,01$).

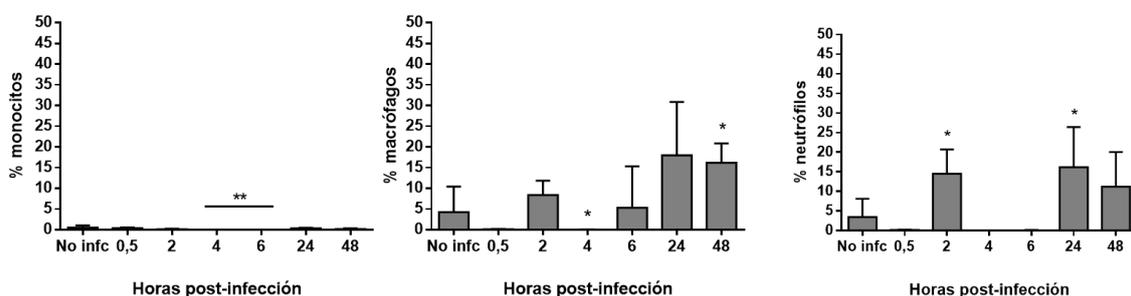


Figura 26. Respuesta celular innata en sangre en animales infectados con Pa M1 y animales no infectados. Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P<0,05$ y ** $P<0,01$ comparado con animales no inf.

La respuesta celular innata en **bazo** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa M1 se muestra en la figura 27.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos aumentó a las 2h ($P<0,05$) y desde las 24h ($P<0,05$). En cuanto al porcentaje de neutrófilos disminuyó a las 4h ($P<0,05$), seguido por un aumento a las 48h ($P<0,05$). Finalmente, no se observó variación en la cinética de la población de monocitos.

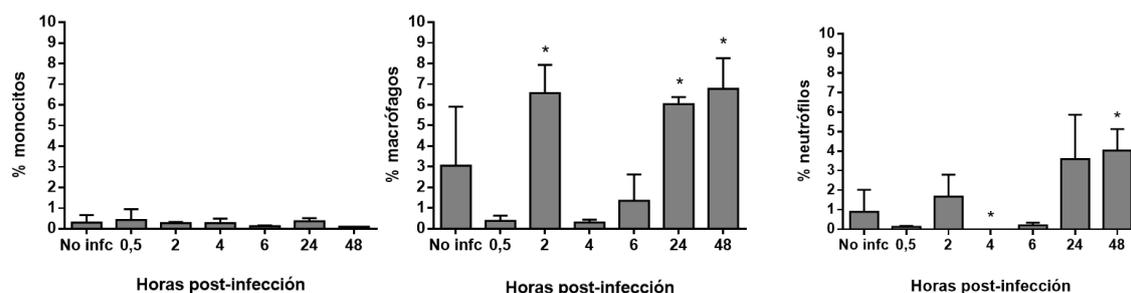


Figura 27. Respuesta celular innata en bazo en animales infectados con Pa M1 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P<0,05$ comparado con animales no infc.

Resultados

3.4. Respuesta celular adaptativa frente a cepas de *P. aeruginosa* con diferente patrón de resistencia a colistina

La respuesta celular adaptativa en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa 147 se muestra en la figura 28.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó desde el día 1 al día 3 ($P<0,001$ y $P<0,01$, respectivamente) y de nuevo el día 30 ($P<0,01$). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 disminuyó desde el día 1 al 3 ($P<0,001$ y $P<0,05$, respectivamente). Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD8 disminuyó los días 1 y 7 ($P<0,001$ y $P<0,05$, respectivamente).

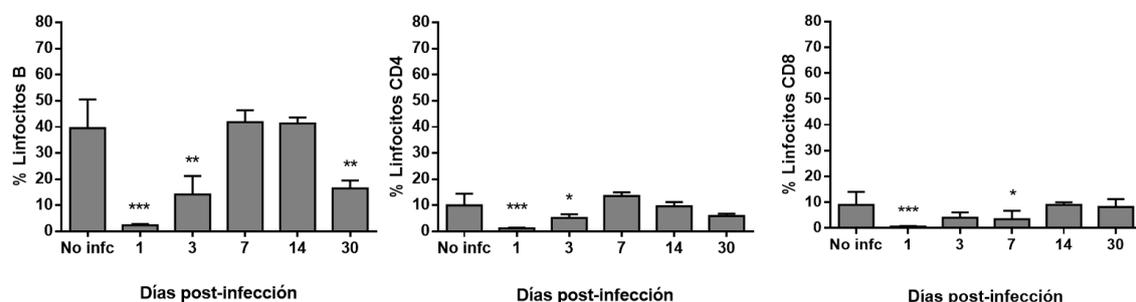


Figura 28. Respuesta celular adaptativa en pulmón en animales infectados con Pa 147 y animales no infectados. Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ y *** $P<0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular adaptativa en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa 147 se muestra en la figura 29.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó los días 1 y 30 ($P<0,001$ y $P<0,05$). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 aumentó desde el día 3 al 7 ($P<0,05$) y disminuyó el día 30 ($P<0,01$). Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD8 aumentó el día 3 ($P<0,001$) seguido de una disminución el día 7 ($P<0,01$) y volviendo a aumentar el día 14 ($P<0,05$).

Resultados

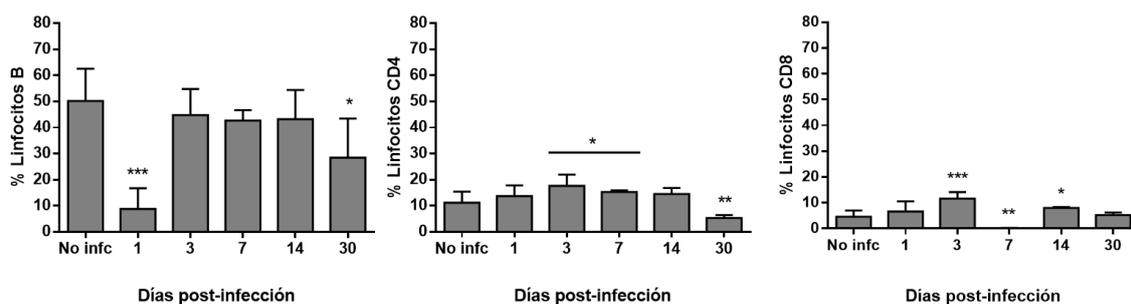


Figura 29. Respuesta celular adaptativa en sangre en animales infectados con Pa 147 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular adaptativa en **bazo** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa 147 se muestra en la figura 30.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B aumentó desde el día 1 al 3 ($P < 0,05$) y de nuevo el día 14 ($P < 0,05$). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 aumentó los días 3 y 30 ($P < 0,05$). Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD8 disminuyó el día 1 ($P < 0,01$) y aumentó los días 3 y 14 ($P < 0,05$).

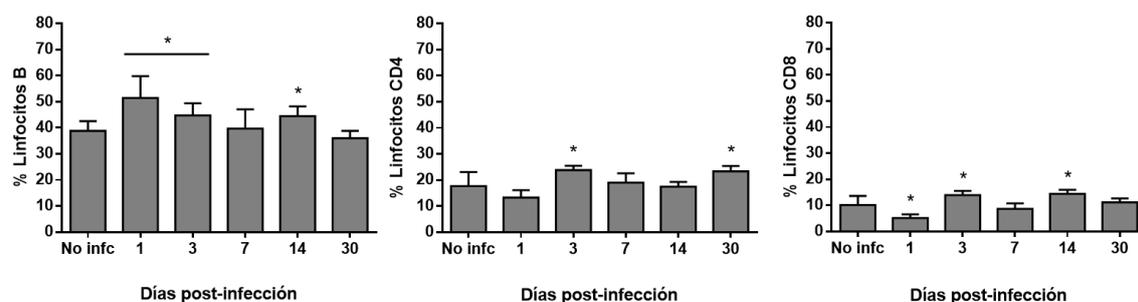


Figura 30. Respuesta celular adaptativa en bazo en animales infectados con Pa 147 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ comparado con animales no infc.

Resultados

La respuesta celular adaptativa en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa M1 se muestra en la figura 31.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó del día 1 al 3 ($P<0,001$) y desde el día 14 ($P<0,01$). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 disminuyó del día 1 al 3 ($P<0,05$ y $P<0,001$, respectivamente) y de nuevo el día 30 ($P<0,05$). Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD8 disminuyó del día 1 al día 3 ($P<0,05$). Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD8 disminuyó del día 1 al día 3 ($P<0,001$ y $P<0,01$, respectivamente).

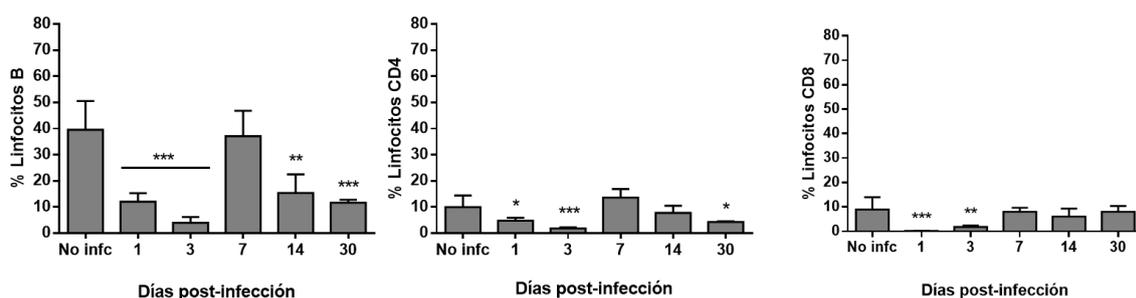


Figura 31. Respuesta celular adaptativa en pulmón en animales infectados con Pa M1 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ y *** $P<0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular adaptativa en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa M1 se muestra en la figura 32.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó desde el día 1 al día 3 ($P<0,001$ y $P<0,01$, respectivamente). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 disminuyó los días 1 y 30 ($P<0,001$ y $P<0,01$, respectivamente). Finalmente, el porcentaje de linfocitos T CD8 disminuyó el día 1 ($P<0,001$) seguido de un aumento desde el día 7 ($P<0,05$).

Resultados

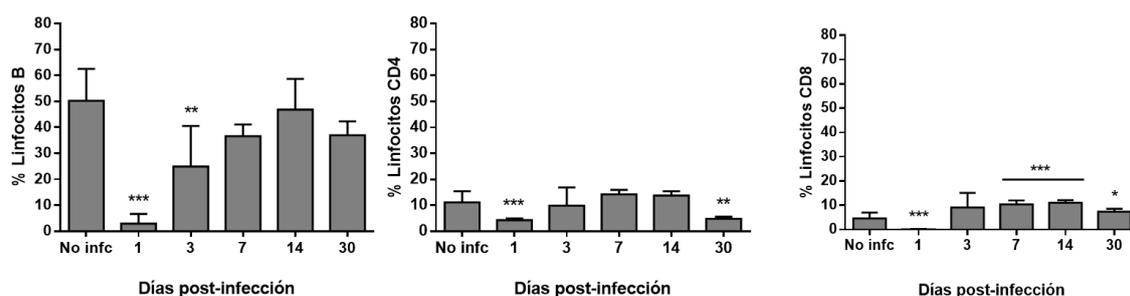


Figura 32. Respuesta celular adaptativa en sangre en animales infectados con Pa M1 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ y *** $P < 0,001$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular adaptativa en **bazo** frente a la neumonía experimental no letal causada por Pa M1 se muestra en la figura 33.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B aumentó el día 3 ($P < 0,01$) y disminuyó el día 30 ($P < 0,01$). En cuanto a los porcentaje de linfocitos T CD4 y CD8 se mantuvieron estables durante todo el tiempo de estudio, excepto un aumento el día 30 ($P < 0,05$) de los CD8.

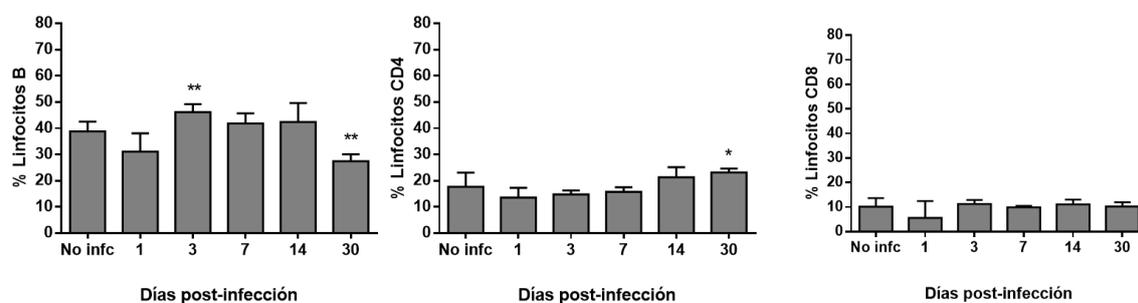


Figura 33. Respuesta celular adaptativa en sangre en animales infectados con Pa M1 y animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 5 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$, y ** $P < 0,01$ comparado con animales no infc.

Resultados

4. Respuesta inmune innata y adaptativa provocada por la mucina porcina

4.1. Respuesta celular innata provocada por la mucina porcina

La respuesta celular innata en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por la mucina porcina se muestra en la figura 34.

Con respecto a animales no infectados, no se observó variación en la cinética de las poblaciones de macrófagos ni de monocitos. En cuanto al porcentaje de neutrófilos aumentó desde los 30 minutos a las 6h ($P<0,05$) y de nuevo a las 48h ($P<0,05$).

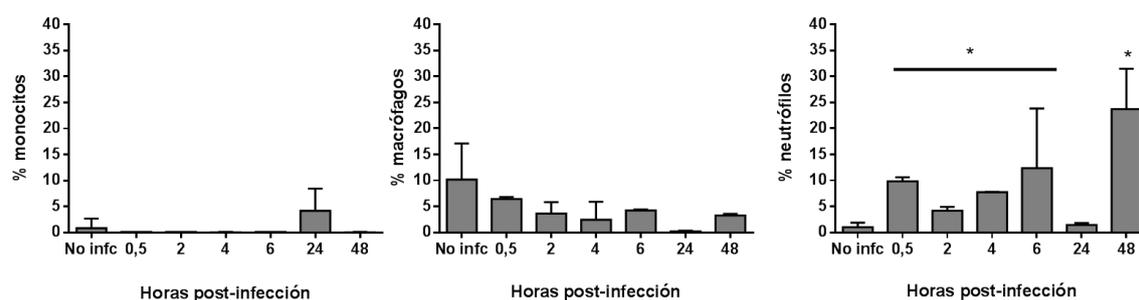


Figura 34. Respuesta celular innata en pulmón provocada por la mucina porcina frente a animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 2 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P<0,05$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular innata en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por la mucina porcina se muestra en la figura 35.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de macrófagos disminuyó a las 24h ($P<0,05$). En cuanto al porcentaje de neutrófilos aumentó a los 30 minutos y a las 6h ($P<0,05$). Finalmente, no se observó variación en la cinética de la población de monocitos.

Resultados

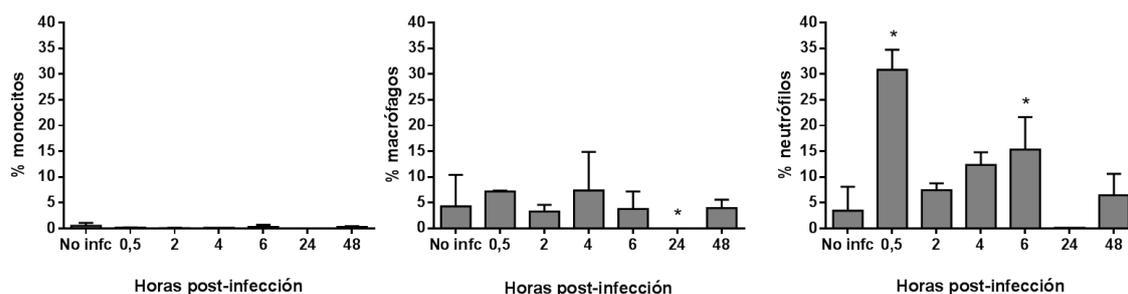


Figura 35. Respuesta celular innata en sangre provocada por la mucina porcina frente a animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de 2 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ comparado con animales no infc.

La respuesta celular innata en **bazo** frente a la neumonía experimental no letal causada por la mucina porcina se muestra en la figura 36.

Con respecto a animales no infectados, no se observó variación en la cinética de las poblaciones de macrófagos ni de neutrófilos. En cuanto al porcentaje de monocitos disminuyó a las 4h ($P < 0,05$).

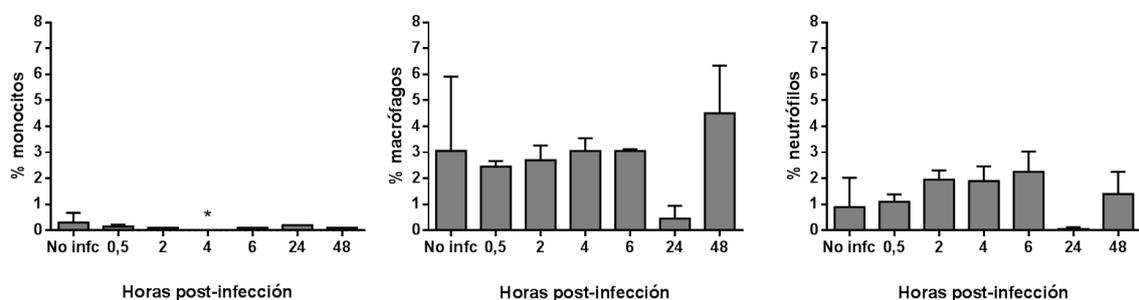


Figura 36. Respuesta celular innata en bazo provocada por la mucina porcina frente a animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada de ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ comparado con animales no infc.

Resultados

La respuesta celular innata en **pulmón** causada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados se muestra en la figura 37.

En comparación con los ratones infectados con cada una de las cepas de *P. aeruginosa*, podemos observar como la mucina porcina produce un aumento de los neutrófilos tan pronto como a los 30 minutos post-infección. En cuanto al porcentaje de monocitos ese aumento no se observó hasta las 24h.

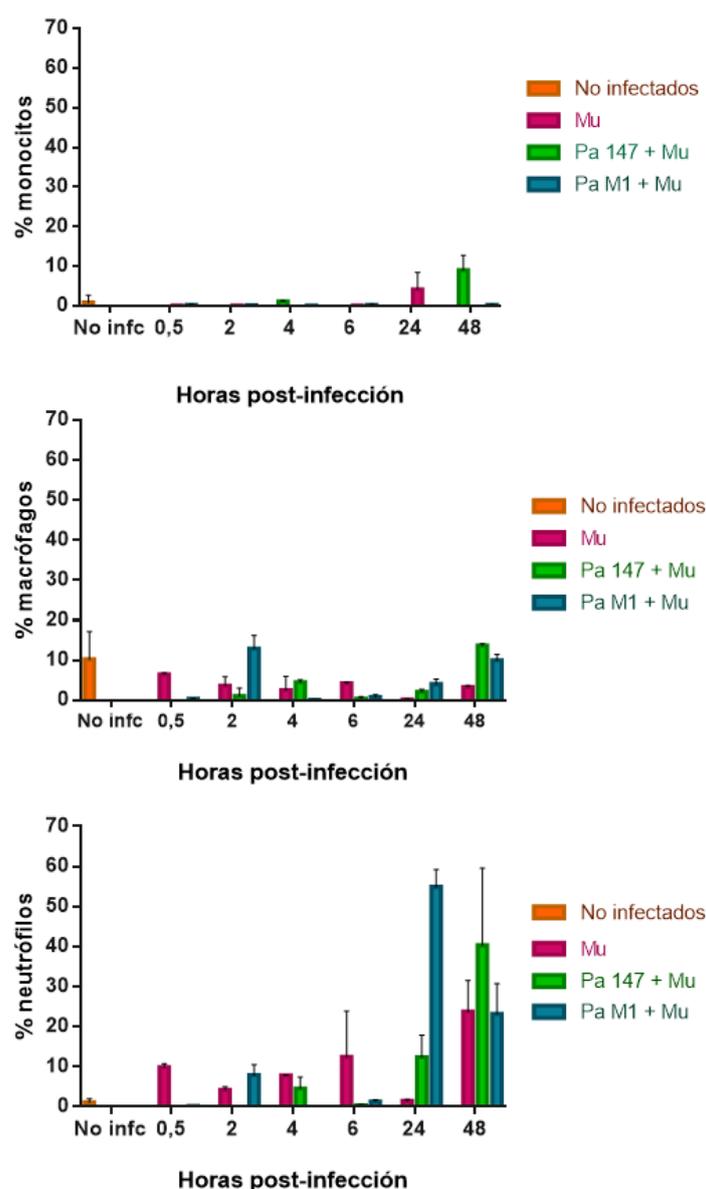


Figura 37. Respuesta celular innata en pulmón provocada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada por cada punto temporal y la desviación típica.

Resultados

La respuesta celular innata en **sangre** causada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados se muestra en la figura 38.

Al igual que en el pulmón, en comparación con los ratones infectados con cada una de las cepas de *P. aeruginosa*, podemos observar como la mucina porcina produce un aumento de los macrófagos y neutrófilos tan pronto como a los 30 minutos post-infección. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de monocitos no se observó esa diferencia.

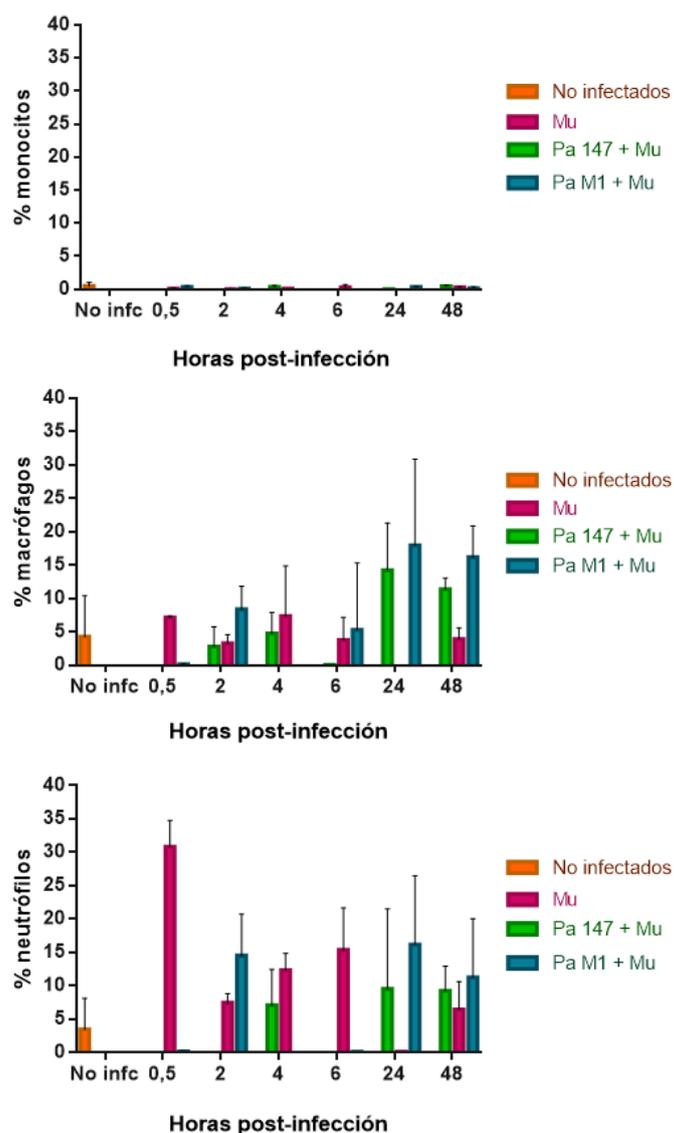


Figura 38. Respuesta celular innata en sangre provocada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada por cada punto temporal y la desviación típica.

Resultados

La respuesta celular innata en bazo causada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados se muestra en la figura 39.

De nuevo, en comparación con los ratones infectados con Pa 147 o Pa M1, podemos observar como la mucina porcina produce un aumento de los neutrófilos tan pronto como a los 30 minutos post-infección, además en los neutrófilos este aumento se mantiene hasta las 6h. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de monocitos y macrófagos no se observó esa diferencia.

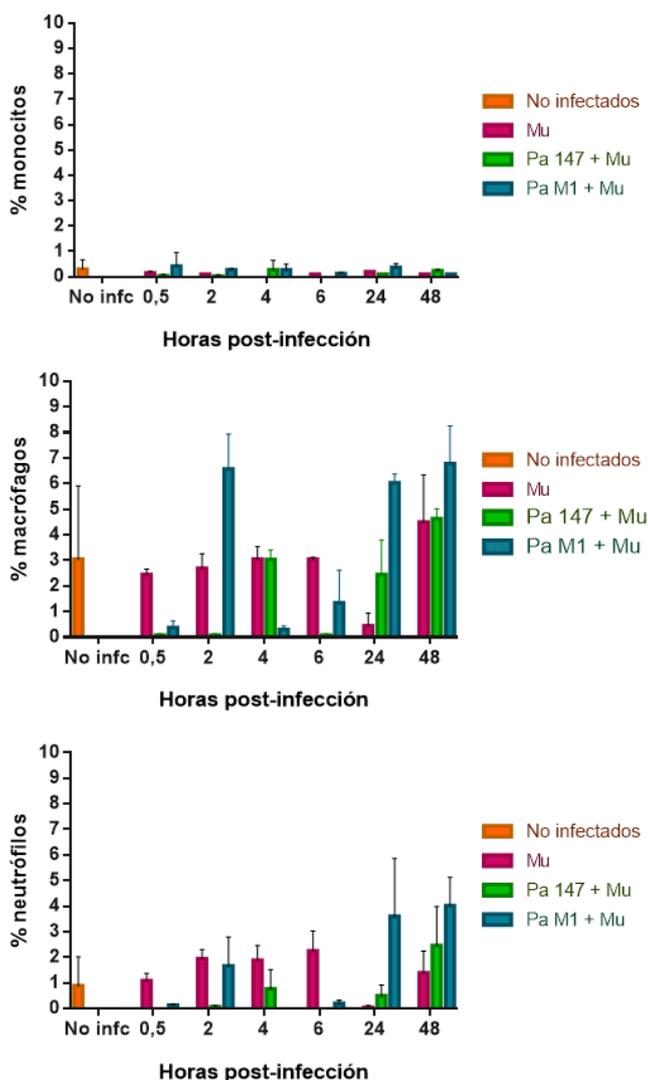


Figura 39. Respuesta celular innata en bazo provocada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de monocitos, macrófagos y neutrófilos. Representación de la media ponderada por cada punto temporal y la desviación típica.

Resultados

4.2. Respuesta celular adaptativa provocada por la mucina porcina

La respuesta celular adaptativa en **pulmón** frente a la neumonía experimental no letal causada por la mucina porcina se muestra en la figura 40.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó desde el día 1 al 7 ($P<0,05$). En cuanto a los porcentajes de linfocitos T CD4 y CD8 disminuyeron del día 1 al 3 ($P<0,05$).

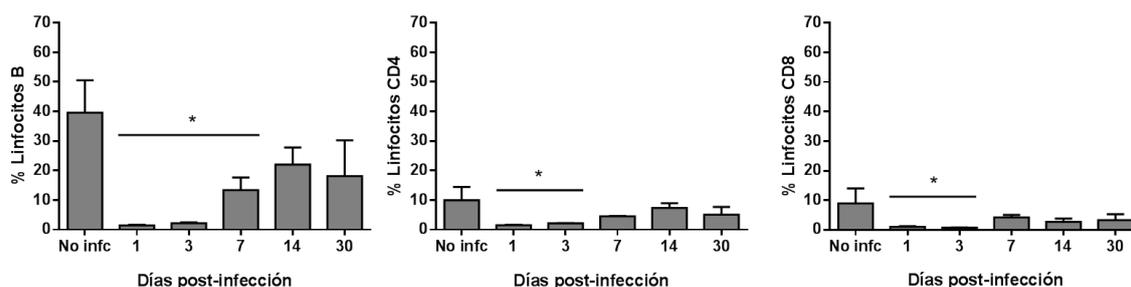


Figura 40. Respuesta celular adaptativa en pulmón en animales infectados con mucina porcina. Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 2 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P<0,05$ comparado con los animales no infectados (No infc).

La respuesta celular adaptativa en **sangre** frente a la neumonía experimental no letal causada por la mucina porcina se muestran en la figura 41.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B disminuyó el día 1 ($P<0,05$). En cuanto al porcentaje de linfocitos T CD4 aumentó el día 1 ($P<0,05$). Finalmente, en cuanto al porcentaje de linfocitos T CD8 aumentó el día 7 ($P<0,05$).

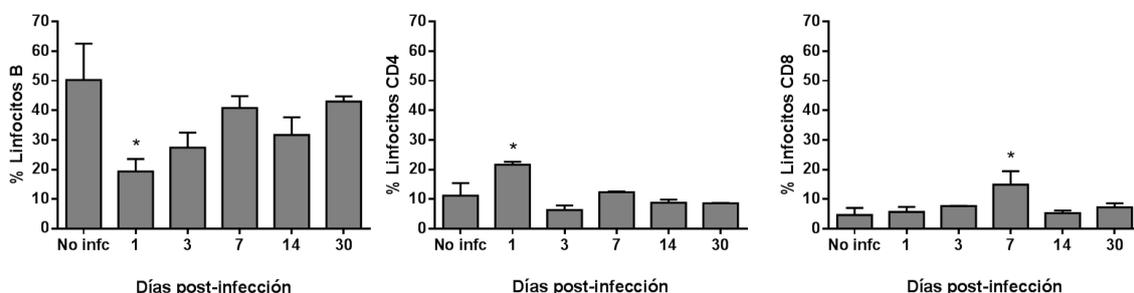


Figura 41. Respuesta celular adaptativa en sangre en animales infectados con mucina porcina. Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8.

Resultados

Representación de la media ponderada de 2 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ comparado con los animales no infectados (No infc).

La respuesta celular adaptativa en bazo frente a la neumonía experimental no letal causada por la mucina porcina se muestra en la figura 42.

Con respecto a animales no infectados, el porcentaje de linfocitos B aumentó desde el día 3 ($P < 0,05$). En cuanto a los porcentajes de linfocitos T CD4 y CD8 no se observó variación en la cinética de las poblaciones respecto a animales no infectados

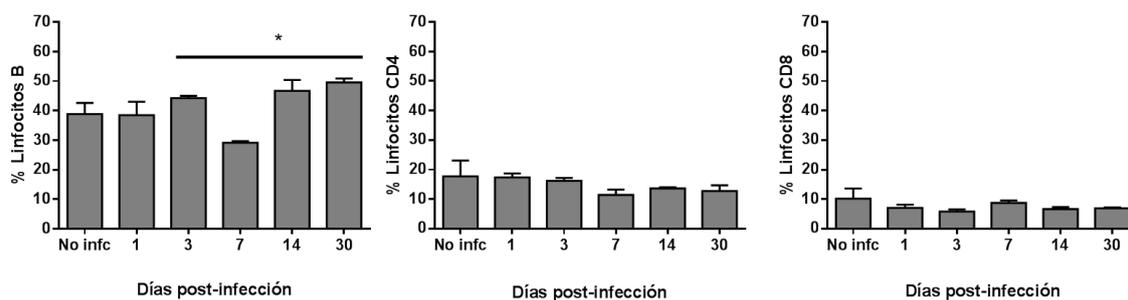


Figura 42. Respuesta celular adaptativa en bazo en animales infectados con mucina porcina. Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada de 2 ratones por cada punto temporal y la desviación típica. * $P < 0,05$ comparado con los animales no infectados (No infc).

Resultados

La respuesta celular adaptativa en **pulmón** causada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados se muestra en la figura 43.

En este caso no se observaron diferencias en cuanto a los porcentajes ni de linfocitos B ni de linfocitos T CD4 y CD8 en comparación con los ratones infectados con Pa 147 ni Pa M1.

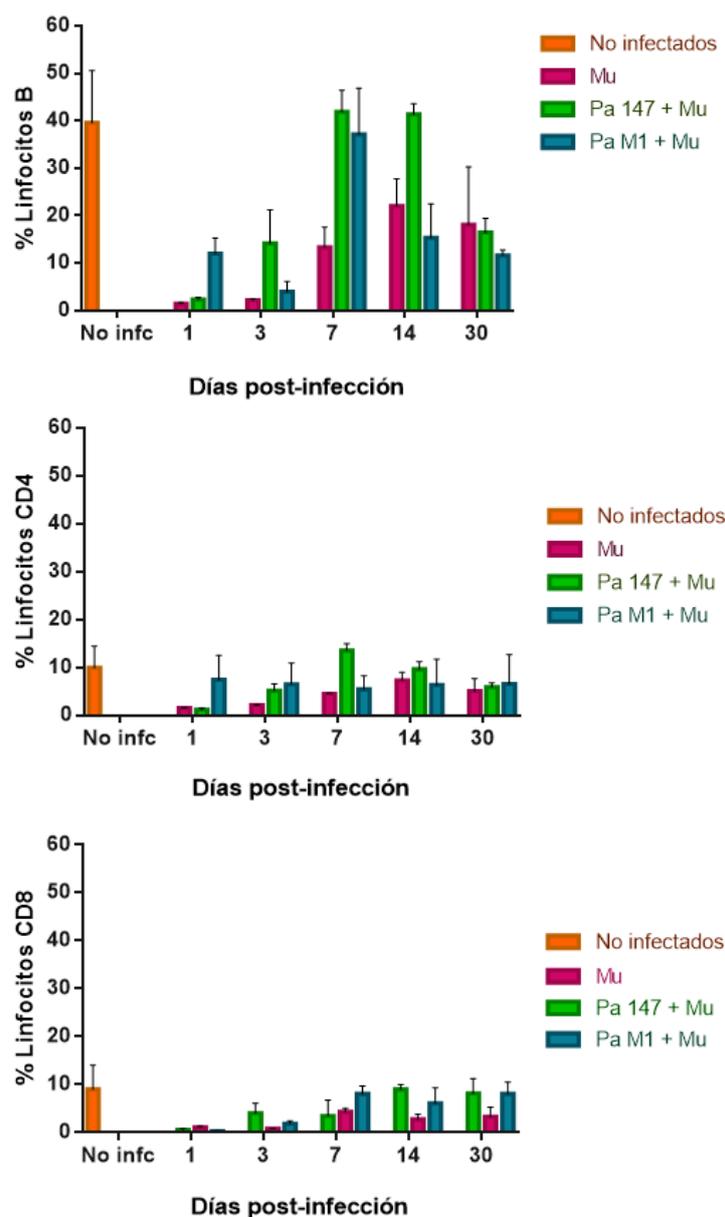


Figura 43. Respuesta celular adaptativa en pulmón provocada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada por cada punto temporal y la desviación típica.

Resultados

La respuesta celular innata en **sangre** causada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados se muestra en la figura 44.

De nuevo, en comparación con los ratones infectados con Pa 147 o Pa M1, podemos observar como la mucina gástrica porcina produce un aumento de linfocitos B y linfocitos T CD4 tan pronto como en el día 1 post-infección,. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de linfocitos T CD8 este aumento no se produce hasta el día 7.

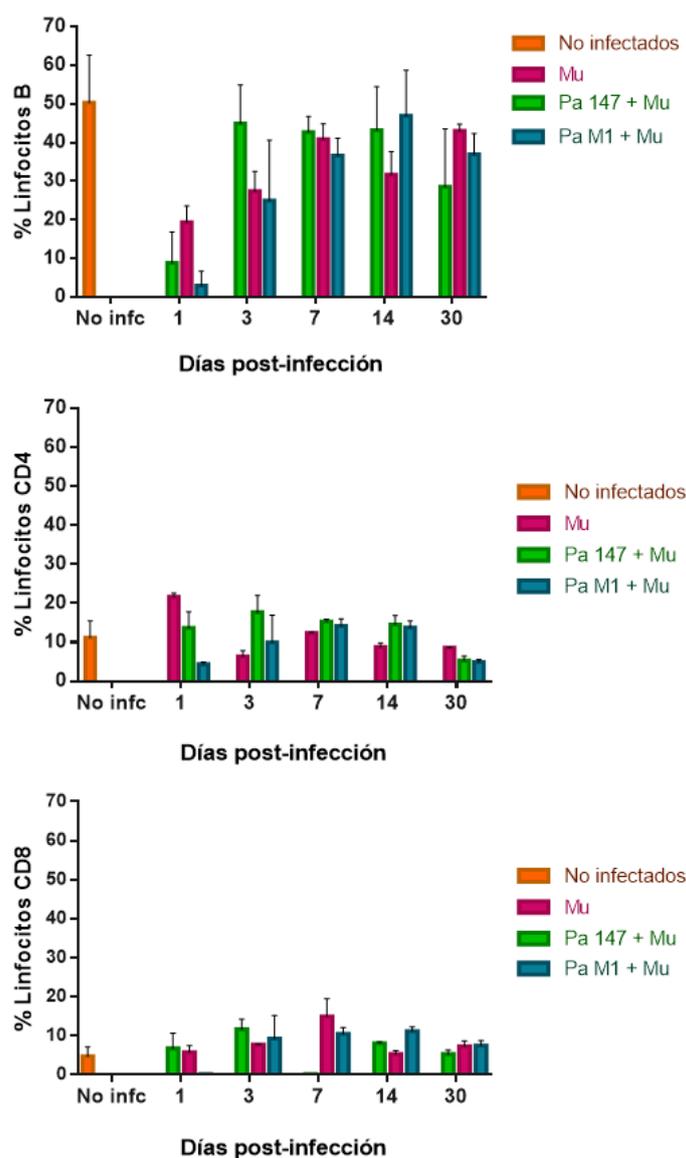


Figura 44. Respuesta celular adaptativa en sangre provocada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada por cada punto temporal y la desviación típica.

Resultados

La respuesta celular adaptativa en bazo causada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados se muestra en la figura 45.

En este caso, en comparación con los ratones infectados con Pa 147 o Pa M1, podemos observar como la mucina gástrica porcina produce un aumento de linfocitos T CD4 y CD8 tan pronto como en el día 1 post-infección,. Sin embargo, en cuanto al porcentaje de linfocitos B este aumento no se produce hasta el día 14 y más notable el día 30.

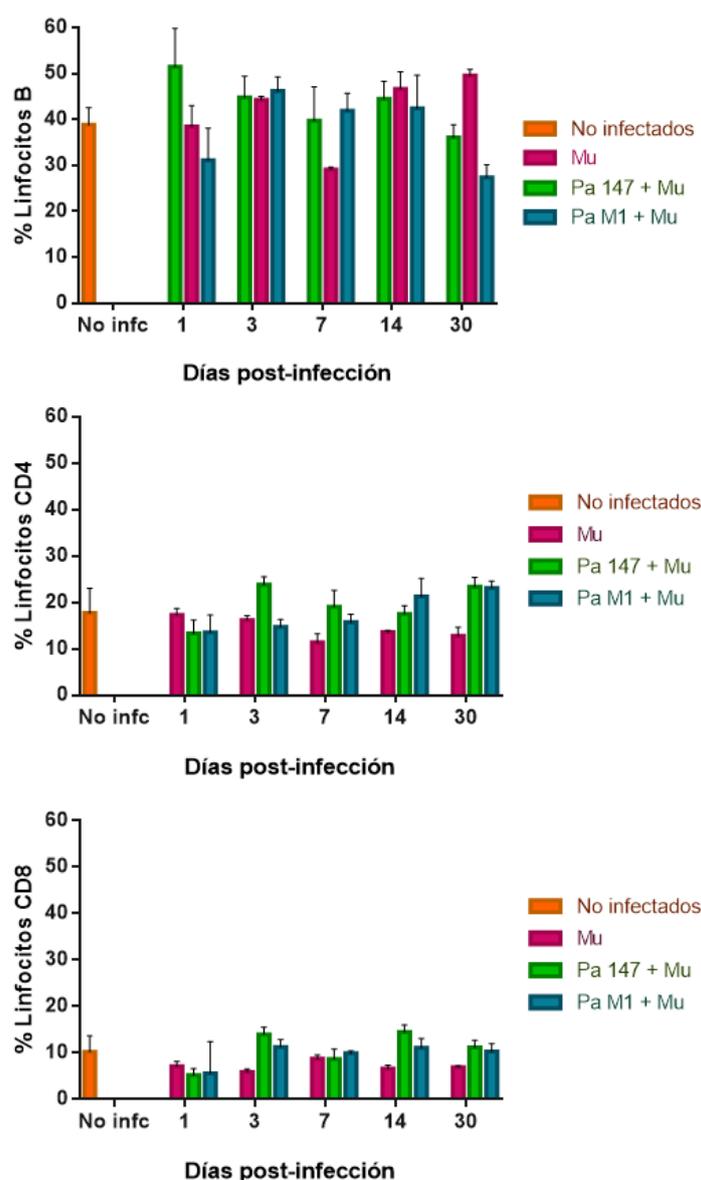


Figura 45. Respuesta celular adaptativa en bazo provocada por la mucina porcina y en animales infectados con Pa 147 y Pa M1 frente a animales no infectados (No infc). Las figuras muestran el % de linfocitos B y linfocitos T CD4 y CD8. Representación de la media ponderada por cada punto temporal y la desviación típica.

Resultados

4.3. Niveles de Interleuquina 22 (IL-22) en tejido pulmonar

Los niveles de IL-22 (pg/mg de proteínas del pulmón) en distintos tiempos temporales se muestran en la figura 46.

Los niveles de IL-22 (pg/mg) tras 4h de inoculación aumentaron tanto en el grupo inoculado sólo con mucina porcina como en los grupos inoculados con Pa 147 o Pa M1 más mucina porcina en comparación con el grupo de animales no inoculados ($P < 0,05$). Tras 6 horas desde la inoculación, se observó una disminución de los niveles de IL-22 en los tres grupos de animales inoculados en comparación con el grupo de animales no inoculados, siendo esta disminución significativa ($P < 0,01$) en los animales infectados con Pa147 o Pa M1 más mucina porcina. Después de 24h, los niveles de IL-22 aumentaron nuevamente en los grupos inoculados con Pa 147 o Pa M1 más mucina porcina ($P < 0,01$) en comparación con los animales inoculados solo con mucina porcina; sin embargo, en el grupo inoculado sólo con mucina porcina ($P < 0,01$) siguió reducido en comparación con el grupo de los animales no inoculados. Finalmente, tras 48h los niveles de IL-22 disminuyeron en los tres grupos de animales inoculados en comparación con el grupo de animales no inoculados ($P < 0,05$).

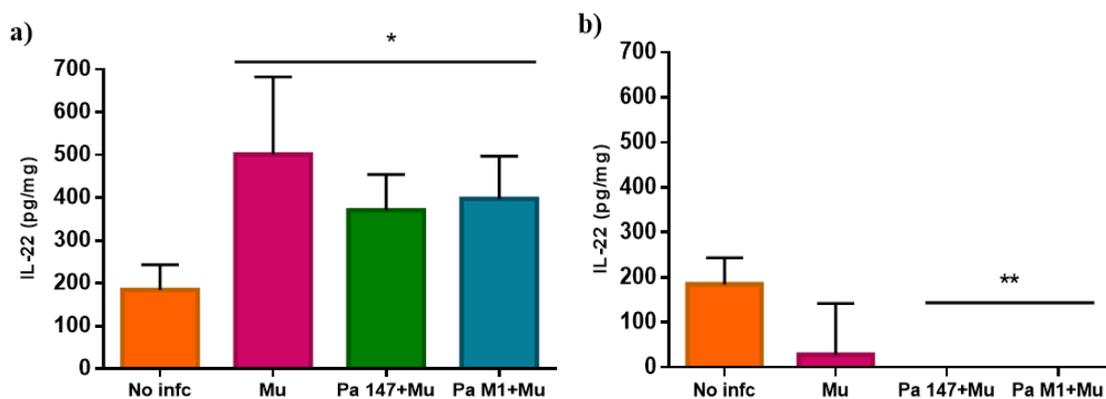


Figura 46. Niveles de IL-22 (pg/mg de proteínas de pulmón) en el tejido pulmonar de ratones sacrificados en diferentes puntos temporales. a) Niveles de IL-22 (pg/mg) a las 4h post-inoculación, b) Niveles de IL-22 (pg/mg) a las 6h post-inoculación, c) Niveles de IL-22 (pg/mg) a las 24h post-inoculación, d) Niveles de IL-22 (pg/mg) a las 48h post-inoculación. Valores expresados como media y desviación estándar. * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ comparado con animales no infectados; y ^{##} $P < 0,01$ comparado con el grupo inoculado con mucina. No infc: No infectados, Mu: Mucina porcina

Resultados

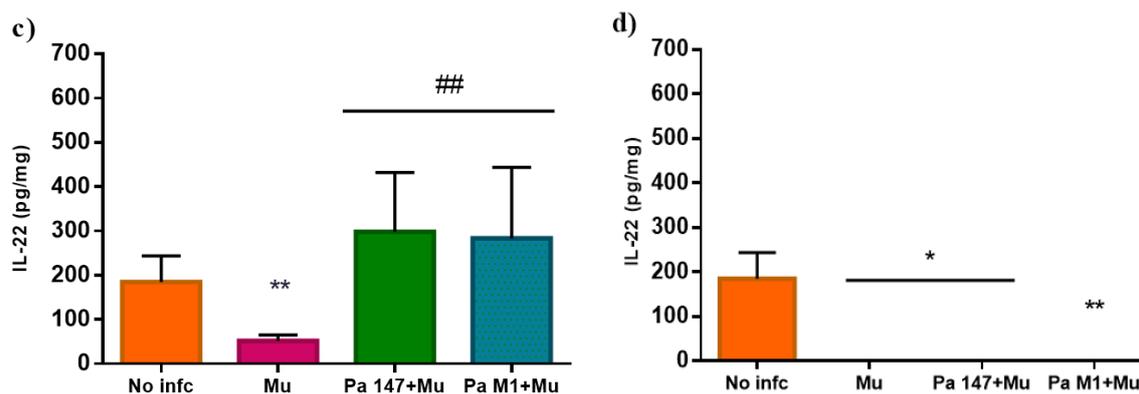


Figura 46. Continuación.

4.4. Estudios histopatológicos

Los resultados del estudio histopatológico de los animales inoculados se muestran en la figura 47.

En el tejido pulmonar de los animales no infectados, no se observó afectación, siendo las vías aéreas y los alveolos histológicamente normales y sin inflamación. En el tejido pulmonar de los animales inoculados con mucina porcina se observó afectación extensa con un infiltrado inflamatorio neutrofílico tanto en zonas alveolares, como bronquiales e intersticiales. Además se apreciaron áreas edematosas, con macrófagos puntuales. Los animales infectados con Pa 147 más mucina porcina, tuvieron el tejido afectado tanto central como periféricamente, con infiltración de neutrófilos dentro de los bronquiolos y en los espacios aéreos. También se observaron macrófagos puntuales, pero escasas áreas edematosas. Finalmente, en los animales infectados con Pa M1 más mucina porcina, los espacios aéreos no estaban visibles, debido a una importante afectación central y periférica, con infiltrado inflamatorio neutrofílico tanto en espacios alveolares como en los bronquiolos. Igualmente, se visualizaron áreas edematosas y macrófagos puntuales.

Resultados

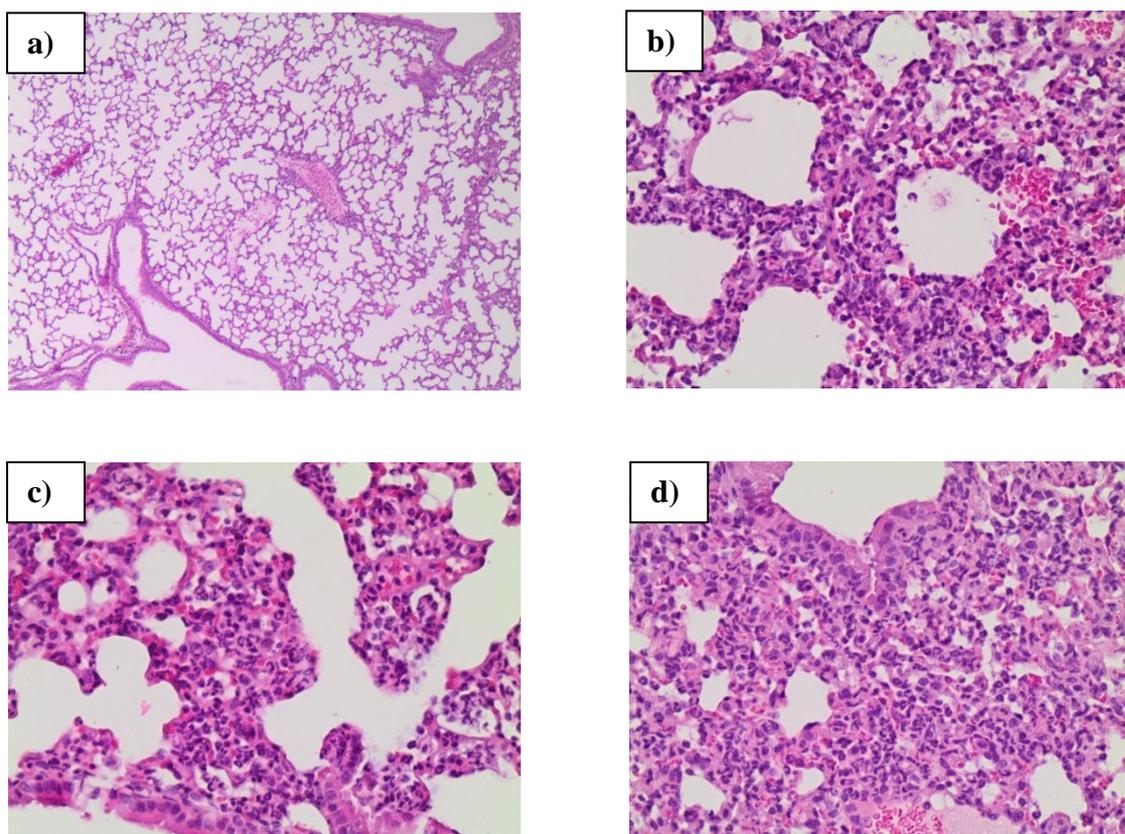


Figura 47. Estudios histopatológicos del tejido pulmonar de ratones sacrificados tras 4h de la inoculación. a) control no infectado; b) inoculado con mucina porcina; c) inoculado con Pa 147 más mucina porcina y d) inoculado con Pa M1 más mucina porcina. Datos representativos de 2 ratones independientes.

4.5. Curvas de crecimiento

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la figura 48.

Con ninguna de las cepas la cinética de crecimiento fue diferente independientemente de estar solas o combinadas con mucina, en condiciones de medio rico (MHB). Sin embargo, en medio mínimo M9 sólo o con la adicción de magnesio y glucosa, la cinética de crecimiento de las cepas junto a mucina porcina fue mayor. Además, con ambas cepas y a pesar que entre las 2 y a las 4 horas en medio mínimo suplementado con magnesio y glucosa sin mucina las cepas tenían un crecimiento más lento, a partir de las 8 horas aumento el crecimiento siendo a las 24 horas similar al observado en los medios ricos estudiados.

Resultados

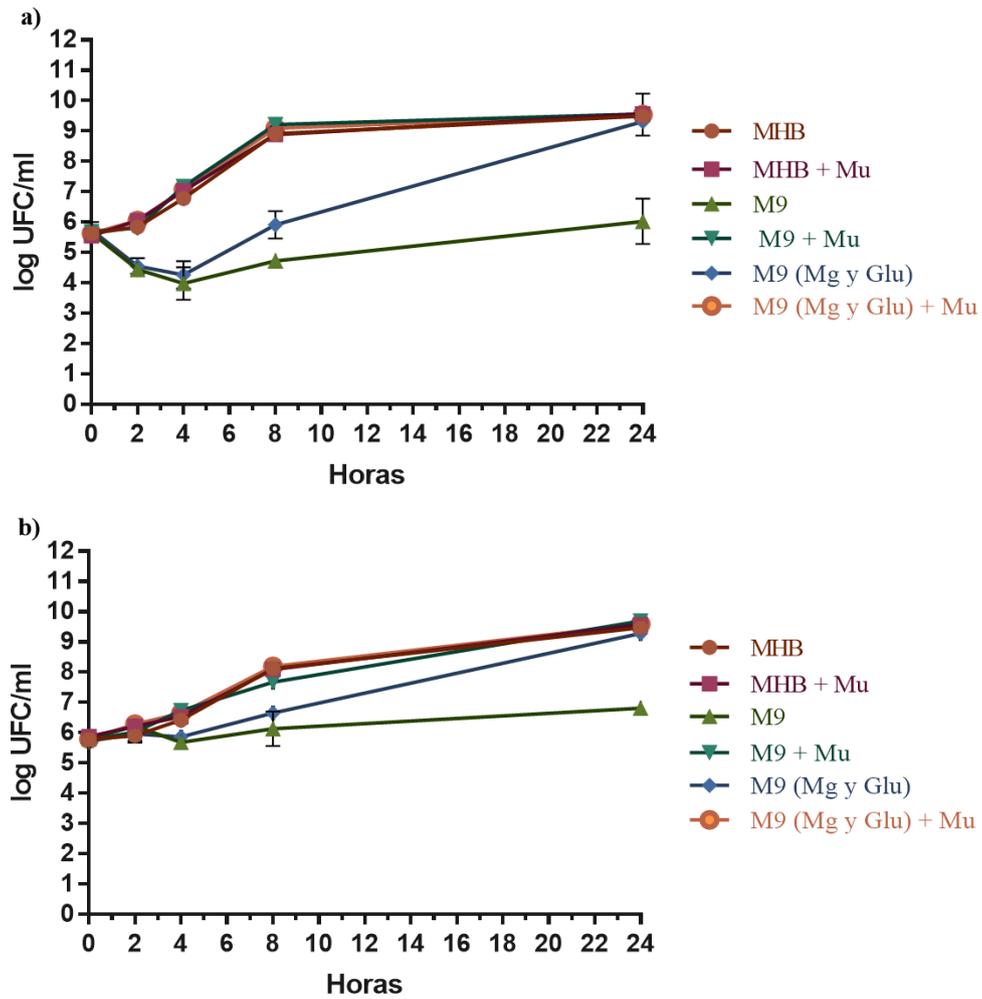


Figura 48. Curvas de crecimiento de las cepas a) Pa147 y b) Pa M1 solas y combinadas con mucina porcina (1%). Representación de la media ponderada de los valores en log UFC/ml y la desviación típica. MHB: *Mueller Hinton Broth*, Mu: Mucina porcina, Mg: Magnesio, Glu: Glucosa

Resultados

CAPÍTULO 2: Eficacia de las células de memoria en modelos letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

1. Evaluación de la eficacia del tratamiento con linfocitos T CD8+ de memoria en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de *A. baumannii* con diferente patrón de resistencia a colistina

Para la cepa Ab CS01, aparte del grupo control, sin tratamiento, se realizaron un total de 3 grupos de tratamientos durante 72 horas, un grupo tratado con linfocitos T CD8+ de memoria y el resto tratados con las diferentes monoterapias de los antimicrobianos.

El resumen de los resultados de los grupos 1 al 3 y del grupo control 0 se detallan en la tabla 7.

La media y SD de los inóculos usados para todos los grupos fue $9,90 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL} \pm 0,09$. Podemos observar que el tratamiento con linfocitos T CD8+ de memoria redujo de manera significativa tanto la carga bacteriana en el tejido pulmonar y en sangre como el porcentaje de bacteriemia y mortalidad en comparación con el grupo control. Esta reducción también fue observada en los tratamientos con tigeciclina y sulbactam.

Tabla 7. Resultados totales de los grupos de tratamientos del 1 al 3 y del grupo control 0 para la cepa Ab CS01.

Grupos	Tratamientos	n	Pulmón (Log UFC/g)	Sangre (Log UFC/ml)	Bacteriemia (%)	Mortalidad (%)
0	CTL	19	$10,38 \pm 0,36$	$9,22 \pm 0,52$	100 (19)	94,74 (19)
1	CD8+ memoria	12	$6,90 \pm 2,80^a$	$3,56 \pm 3,92^b$	58,33 (5) ^b	41,67 (5) ^b
2	TGC	14	$7,90 \pm 2,78^a$	$5,03 \pm 3,48^b$	78,57 (11)	57,14 (8) ^a
3	SB	15	$6,18 \pm 1,53^c$	$2,18 \pm 1,12^c$	86,67 (13)	6,67 (1) ^{c,d}

CTL: controles, TGC: Tigeciclina, SB: Sulbactam. ^a P<0,05; ^b P<0,01; ^c P<0,001 con respecto al CON; ^d P<0,05 con respecto al tratamiento con CD8+ memoria.

Resultados

Para la cepa Ab CR17, aparte del grupo control, sin tratamiento, se realizaron un total de 3 grupos de tratamientos durante 72 horas, un grupo tratado con linfocitos T CD8+ de memoria y el resto tratados con las diferentes monoterapias de los antimicrobianos.

El resumen de los resultados de los grupos 1 al 3 y del grupo control 0 se detallan en la tabla 8.

La media y SD de los inóculos usados para todos los grupos fue $9,33 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL} \pm 0,02$. Podemos observar que el tratamiento con linfocitos T CD8+ de memoria redujo la carga bacteriana en pulmón y sangre al igual que el porcentaje de bacteriemia y de manera significativa también el de mortalidad, siendo igual de eficaz que el tratamiento con tigeciclina. Sin embargo, observamos que el tratamiento con sulbactam fue el más eficaz con diferencias significativas en la carga bacteriana en el tejido pulmonar y en sangre y en ñps porcentajes de bacteriemia y mortalidad.

Tabla 8. Resultados totales de los grupos de tratamientos del 1 al 3 y del grupo control 0 para la cepa Ab CR17.

Grupos	Tratamientos	n	Pulmón (Log UFC/g)	Sangre (Log UFC/ml)	Bacteriemia (%)	Mortalidad (%)
0	CTL	12	9,49 ± 1,66	7,77 ± 2,50	100 (12)	83 (10)
1	CD8+ de memoria	11	7,90 ± 1,94	4,51 ± 3,73	73 (8)	36 (4)^a
2	TGC	9	7,96 ± 2,56	4,61 ± 4,24	67 (6)	44 (4)
3	SB	10	5,19 ± 1,19^{c,d}	1,19 ± 1,31^c	50 (5)^b	10 (1)^b

CTL: controles, TGC: Tigeciclina, SB: Sulbactam. ^a P<0,05; ^b P<0,01; ^c P<0,001 con respecto al CTL ^d P<0,01 con respecto al tratamiento con CD8+ memoria.

2. Evaluación de la eficacia del tratamiento con linfocitos B (CD19+) de memoria en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de *P. aeruginosa* con diferente patrón de resistencia a colistina

Para la cepa Pa 147, aparte del grupo control, sin tratamiento, se realizaron un total de 3 grupos de tratamiento durante 72 horas, un grupo tratado con linfocitos CD19+ de memoria y el resto tratados con las diferentes monoterapias de los antimicrobianos.

Resultados

El resumen de los resultados de los grupos 1 al 3 comparados con el control 0 se detallan en la tabla 9.

La media y SD de los inóculos usados para todos los grupos fue $8,59 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL} \pm 0,09$. Podemos observar que el tratamiento con linfocitos CD19+ de memoria redujo la carga bacteriana en pulmón y sangre, y de manera significativa los porcentajes de bacteriemia y mortalidad. Esta reducción también fue observada con el tratamiento con ceftazidima, sin embargo en este caso también hubo diferencias significativas en la carga bacteriana del tejido pulmonar y de sangre.

Tabla 9. Resultados totales de los grupos de tratamientos del 1 al 3 y del grupo control 0 para la cepa Pa 147.

Grupos	Tratamientos	n	Pulmón (Log UFC/g)	Sangre (Log UFC/ml)	Bacteriemia (%)	Mortalidad (%)
0	CTL	19	9,15 ± 1,21	6,71 ± 0,89	100 (19)	100 (19)
1	CD19+ memoria	10	6,56 ± 3,57	3,76 ± 3,29	60 (6)^{a,c}	50 (5)^{b,d}
2	CMS	16	8,98 ± 0,72	5,70 ± 1,75	100 (16)	100 (16)
3	CAZ	12	7,16 ± 1,72^b	2,78 ± 2,58^b	67 (8)^a	58 (7)^b

CTL: controles, CMS: Colistin metato sódico, CAZ: Ceftazidima. ^a P<0,05; ^b P<0,01 con respecto al CTL. ^c P<0,05; ^d P<0,01 con respecto al tratamiento con CMS.

Para la cepa Pa M1, aparte del grupo control, sin tratamiento, se realizaron un total de 3 grupos de tratamiento durante 72 horas, un grupo tratado con linfocitos CD19+ de memoria y el resto tratados con las diferentes monoterapias de los antimicrobianos.

El resumen de los resultados de los grupos 1 al 5 y del grupo control 0 se detallan en la tabla 10.

La media y SD de los inóculos usados para todos los grupos fue $9,66 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL} \pm 0,06$. En este caso, podemos observar que el tratamiento con linfocitos CD19+ de memoria sólo redujo el porcentaje de mortalidad, al igual que el tratamiento con colistina. Sin embargo, el tratamiento con ceftazidima fue el más eficaz ya que redujo de manera significativa tanto el porcentaje de mortalidad como la carga bacteriana en el tejido pulmonar.

Resultados

Tabla 10. Resultados totales de los grupos de tratamientos del 1 al 3 y del grupo control 0 para la cepa Pa M1.

Grupos	Tratamientos	n	Pulmón (Log UFC/g)	Sangre (Log UFC/ml)	Bacteriemia (%)	Mortalidad (%)
0	CTL	13	9,80 ± 0,47	6,18 ± 1,36	100 (13)	100 (13)
1	CD19+ memoria	9	9,75 ± 0,57	5,64 ± 2,44	100 (9)	78 (7)
2	CMS	10	8,94 ± 1,06	5,24 ± 2,05	100 (10)	70 (7)
3	CAZ	10	8,21 ± 0,97^{b,c}	5,24 ± 1,70	100 (10)	60 (6)^a

CTL: controles, CMS: Colistinmetato sódico, CAZ: Cefotaxidima. ^a P<0,05; ^b P<0,01 con respecto al CTL; ^c P<0,05 con respecto al tratamiento con CD19+ memoria.

Resultados

CAPÍTULO 3: Eficacia de la inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas en IgM en modelos letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*

1. Evaluación de los tratamientos con inmunoglobulinas enriquecidas en IgM en monoterapia y en combinación con antimicrobianos en un modelo letal de neumonía murino causada por cepas de *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina.

Para la cepa Pa 147, aparte del grupo control, sin tratamiento, se realizaron un total de 5 grupos de tratamiento durante 72 horas, un grupo tratado con IgIV enriquecidas en IgM y el resto tratados con las diferentes monoterapias de antimicrobianos y su combinación con IgIV (IgM).

El resumen de los resultados de los grupos 1 al 5 comparados con el control 0 se detallan en la Tabla 11.

La media y SD de los inóculos usados para todos los grupos fue $8,59 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL} \pm 0,09$. Podemos observar que el tratamiento combinado de IgIV enriquecida en IgM con los antimicrobianos, ya sea colistina o ceftazidima, redujeron significativa tanto la carga bacteriana en el tejido pulmonar y en sangre, como los porcentajes de bacteriemia y mortalidad. Esta reducción de la carga bacteriana y de los porcentajes de bacteriemia y mortalidad también fueron observados en el tratamiento con ceftazidima en monoterapia.

Para la cepa Pa M1, aparte del grupo control, sin tratamiento, se realizaron un total de 5 grupos de tratamiento de 72 horas, un grupo tratado con IgIV enriquecidas en IgM y el resto tratados con las diferentes monoterapias de antimicrobianos y su combinación con IgIV (IgM).

El resumen de los resultados de los grupos 1 al 5 comparados con el control 0 se detallan en la tabla 12.

La media y SD de los inóculos usados para todos los grupos fue $9,66 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/mL} \pm 0,06$. En este caso, también podemos observar que los tratamientos combinados con IgIV enriquecida en IgM redujeron el contaje bacteriano en el tejido pulmonar y en sangre y el porcentaje de mortalidad. También observamos que esta reducción en el

Resultados

porcentaje de mortalidad también se produjo con todos los tratamiento dados en monoterapia.

Tabla 11. Resultados totales de los grupos de tratamientos del 1 al 5 y del grupo control 0 para la cepa Pa 147.

Grupos	Tratamientos	n	Pulmón (Log UFC/g)	Sangre (Log UFC/ml)	Bacteriemia (%)	Mortalidad (%)
0	CTL	19	9,15 ± 1,21	6,71±0,89	100 (19)	100 (19)
1	IgIV (IgM)	10	8,37 ± 1,09	6,62±0,87	100 (10)	90 (9)
2	CMS	16	8,98±0,72	5,70±1,75	100 (16)	100 (16)
3	CAZ	12	7,16±1,72 ^b	2,78±2,58 ^{b,e}	67 (8) ^a	58 (7) ^b
4	CMS + IgIV (IgM)	10	6,75±2,06	3,99±2,82	70 (7) ^{a,g}	70 (7) ^{a,g}
5	CAZ + IgIV (IgM)	11	6,95±1,33 ^b	1,89±1,10 ^{c,f}	80 (9)	36 (4) ^{c,d}

CTL: controles, IgIV (IgM): Inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas en IgM, CMS: Colistinmetato sódico, CAZ: Ceftazidima. ^a P<0,05; ^b P<0,01; ^c P<0,001 con respecto al CTL. ^d P<0,05; ^e P<0,01; ^f P<0,001 con respecto al tratamiento con IgIV (IgM). ^g P<0,05 con respecto al tratamiento con CMS.

Tabla 12: Resultados totales de los grupos de tratamientos del 1 al 5 y del grupo control 0 para la cepa Pa M1.

Grupos	Tratamientos	n	Pulmón (Log UFC/g)	Sangre (Log UFC/ml)	Bacteriemia (%)	Mortalidad (%)
0	CTL	13	9,80±0,47	6,18±1,36	100 (13)	100 (13)
1	IgIV (IgM)	8	9,42±1,12	6,78±1,14	100 (8)	75 (6)
2	CMS	10	8,94±1,06	5,24±2,05	100 (10)	70 (7)
3	CAZ	10	8,21±0,97 ^b	5,24±1,70	100 (10)	60 (6) ^a
4	CMS + IgIV (IgM)	9	7,90±1,30 ^a	3,36±3,23	56 (5) ^{a,c}	89 (8)
5	CAZ + IgIV (IgM)	9	7,41±1,21 ^b	4,35±1,92	100 (9)	67 (6)

Resultados

CTL: controles, IgIV (IgM): Inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas en IgM, CMS: Colistinmetato sódico, CAZ: Ceftazidima. ^a P<0,05; ^b P<0,01 con respecto al CTL. ^c P<0,05 con respecto al tratamiento con CMS.

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1: Respuesta inmune celular frente a modelos no letales de neumonía experimental causada por multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, con diferente patrón de resistencia a colistina

Los resultados obtenidos en el presente capítulo, describen la caracterización de modelos no letales de neumonía experimental causados por cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* y de *P. aeruginosa* con diferentes patrones de resistencia a colistina. Además, describen la respuesta inmune celular desencadenada por este tipo de infecciones, permitiéndonos conocer qué células están implicadas en la resolución de la infección, con la finalidad de poder modificar la respuesta inmune del huésped para diseñar un tratamiento inmune como adyuvante a antimicrobianos en el tratamiento de este tipo de infecciones.

Cómo se comentó en la introducción de este trabajo, las infecciones causadas por bacterias multirresistentes, en específico por *A. baumannii* y *P. aeruginosa* están asociadas con estancias hospitalarias largas y elevadas morbi-mortalidades, convirtiéndolas en patógenos críticos, según la OMS, para los que es urgentemente la búsqueda de nuevos tratamientos (10).

En primer lugar, en este estudio se ha detallado el aumento del porcentaje de neutrófilos en tejidos y sangre, resolviendo la infección en 48 horas en todas las cepas estudiadas. Cabe destacar que las cepas resistentes a colistina Ab CR17 y Pa M1, estos porcentajes alcanzan su pico más rápidamente, lo que podría deberse a que el inóculo para caracterizar el modelo no letal de neumonía experimental fue mayor en estas dos cepas, consecuencia de la pérdida de virulencia que tienen estas al volverse resistentes a colistina. Los resultados obtenidos, concuerdan con los publicados por Karim *et al.*, y Kim *et al.*, que describieron el papel protector de los neutrófilos, al señalar una mayor prevalencia de infecciones en pacientes neutropénicos (140, 228). Igualmente, Van Faassen *et al.*, indicaron el rápido reclutamiento de neutrófilos observado tras una infección murina intra-nasal por *A. baumannii* ATCC17961 (229); De la misma manera, Tsuchiya *et al.*, indicaron que el reclutamiento de neutrófilos en pulmones se producía tras un día de infección causada por una cepa clínica de *A. baumannii* en un modelo murino de neumonía (137). Existen otros estudios experimentales de infección por cepas de *A. baumannii*, cómo bacteriemia (138), septicemia (230) o infección de piel y partes blandas (139), que detallan el reclutamiento temprano de los neutrófilos a la zona

Discusión

de infección. De la misma manera, en neumonías experimentales en ratón por cepas de *P. aeruginosa*, se ha indicado la importancia de los neutrófilos en la respuesta temprana del huésped, detallándose el aumento en la concentración bacteriana en ratones neutropénicos (231).

Igualmente, en los resultados detallados de este estudio, se detalla el aumento temprano en el porcentaje de macrófagos. Es conocido, que existen macrófagos residentes en los tejidos, como son los macrófagos alveolares (141, 231), estas células se hallan en el tejido antes de que se establezca la infección, y por tanto antes del reclutamiento de neutrófilos al sitio de la infección. Así, podemos ver en nuestros resultados que, 30 minutos después de las infecciones causadas por las cepas de *A. baumannii*, independientemente de la susceptibilidad a colistina que tenían, no existían diferencias en el porcentaje de macrófagos en pulmón entre los animales no infectados y los animales infectados. Además de la función de los macrófagos en la presentación de antígenos y en la estimulación de la señalización de linfocitos T, nuestros resultados nos hacen pensar que tienen un papel fundamental en ayudar a controlar la infección en los primeros momentos tras la infección y mientras llegan los neutrófilos. Acorde a esta hipótesis, existe un estudio *in vitro* que mostró que la fagocitosis por parte de los macrófagos, era tan temprana como 10 minutos después de la interacción entre macrófagos y *A. baumannii* (141). Nuestros resultados muestran que en bazo, el reclutamiento de macrófagos fue más rápido en ratones infectados con las cepas resistentes a colistina, independientemente del patógeno, Ab CR17 y Pa M1. Un estudio de neumonía murina por *A. baumannii* publicado por Qiu *et al.*, demostró que la depleción de los macrófagos aumentaba la concentración bacteriana en pulmón (141). Sin embargo, a diferencia de lo que se observaba en estudios en animales con depleción de neutrófilos (229), la falta de macrófagos no aumentaba la mortalidad (137, 141). En el caso de infecciones causadas por cepas de *P. aeruginosa* y al contrario de lo indicado en infecciones por *A. baumannii*, los estudios de Cohen *et al.*, demuestran que la depleción de macrófagos alveolares mejora significativamente la concentración bacteriana y la supervivencia en la neumonía experimental por cepas de *P. aeruginosa* (232). Esto puede deberse a que el papel de los macrófagos en la señalización pro-inflamatoria podría estimularse en exceso, produciendo daños debido a procesos inflamatorios.

Discusión

Nuestros resultados, demuestran que la contribución de la respuesta inmune adaptativa celular en la resolución de las neumonías no letales causadas por cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* y de *P. aeruginosa*, con distinto patrón de resistencia a colistina, fue escasa. Existen diversos estudios enfocados en la inmunidad humoral con la finalidad de diseñar vacunas efectivas y seguras frente a estos patógenos (108, 164, 165, 189). En nuestros resultados, el porcentaje de linfocitos B en el tejido pulmonar y sangre, fue similar independientemente de los patógenos o cepas, disminuyendo el día 1 tras la infección en todas las cepas. Contrariamente, en bazo, los porcentajes de linfocitos B aumentaron los días 1 y 3 tras la infección, excepto en la cepa Pa M1 que sólo aumentó el día 3.

En cuanto a los linfocitos T (CD4 y CD8), los resultados de nuestro estudio demuestran que en el tejido pulmonar disminuyen independientemente del patógeno y de la cepa estudiada tras 1 y 3 días de la infección, siendo esta disminución algo más lenta en el caso de la cepa de *A. baumannii* resistente a colistina Ab CR17, en que se observó tras 3 y 7 días del inicio de la infección y los linfocitos T CD8+ de la cepa de *P. aeruginosa* resistente a colistina Pa 147 que se redujo los días 1 y 7 de la infección. En bazo, la respuesta fue muy diferente en cada patógeno, en las cepas de *A. baumannii* independientemente de la cepa, se observó una reducción de linfocitos T los días 7 y 14, excepto en los linfocitos T CD8+ de la cepa sensible a colistina. En cambio en las cepas de *P. aeruginosa*, los niveles de linfocitos T CD4 aumentaron los días 3 y 30 post-infección en la cepa sensible a colistina Pa 147 y sólo en el día 30 en la cepa resistente a colistina Pa M1. En cuanto a los niveles de linfocitos T CD8+, sólo se produjo una disminución el día 1, seguido de un aumento los días 3 y 7 en la cepa sensible a colistina. Finalmente, en sangre los linfocitos T permanecieron estables en las cepas de *A. baumannii* independientemente de la susceptibilidad de la cepa a colistina, excepto en la cepa sensible a colistina se produjo un aumento en la cepa Ab CS01 el día 30 post-infección. Por el contrario, la cinética de linfocitos T en *P. aeruginosa* fue muy diferente dependiendo de la cepa, observándose un aumento de linfocitos T tras 3 días de infección por la cepa sensible a colistina Pa 147, y contrariamente para la cepa resistente a colistina, se observó una disminución tras 1 día de infección. Hasta donde conocemos, este es el primer estudio que muestra la dinámica de linfocitos T en infecciones por bacilos Gram-negativos no fermentadores como son *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. Existen modelos experimentales de neumonía en ratón por cepas de *P.*

Discusión

aeruginosa, que analizan la participación de linfocitos T, en el contexto de la fibrosis quística y del desarrollo de vacunas (231).

Para la caracterización de los modelos de neumonía no letal por cepas de *P. aeruginosa* (Pa 147 y Pa M1), fue necesaria la utilización de mucina porcina. Por este motivo, pensamos necesario realizar estudios para ver si influía en la respuesta inmune celular desencadenada. Estos estudios, demostraron que la inoculación con mucina porcina afectaba tanto a nivel de respuesta inmune celular como a nivel histopatológico. Es conocido, que las infecciones producidas por algunas cepas de *P. aeruginosa* producen hiper-secreción de mocos en el tracto respiratorio. Esta mucosa proporciona una capa protectora de células epiteliales subyacentes y es la barrera principal contra los posibles patógenos (233, 234). Un gran componente del moco es la mucina, una proteína fuertemente glucosilada producida por las células epiteliales que proporciona protección contra el ambiente externo, protege contra la activación de la respuesta inflamatoria en la barrera epitelial, ayuda en la reparación de los tejidos y participa en la señalización celular (235). Sin embargo, el aumento de las cantidades de mucina, puede disminuir la resistencia del huésped a la infección mediante la inhibición de la vía del complemento del huésped (48). Un estudio de nuestro grupo (236), demostró que la mucina no era tóxica para los ratones, ni afectaba a su mortalidad. Sin embargo este trabajo, demuestra que los ratones inoculados con mucina porcina, presentan una respuesta inmune celular más rápida que, incluso, la que se despierta en animales inoculados con *P. aeruginosa* (Pa 147 y Pa M1) más mucina porcina. Nuestros resultados, demuestran que esta diferencia es importante en la respuesta celular innata, aumentando el porcentaje de neutrófilos y macrófagos a los 30 minutos de la inoculación con mucina. Los estudios histopatológicos, demostraron que existían daños tisulares en pulmón tras 4 horas de inoculación con mucina porcina, siendo similares a los observados en la inoculación con cepas de *P. aeruginosa* mas mucina porcina, observándose en todos los casos, afectación importante con infiltrado inflamatorio neutrofilico tanto en zonas alveolares, como bronquiales e intersticiales, con áreas edematosas y puntuales macrófagos. Igualmente, en estos animales nos interesó analizar los niveles de IL-22 en pulmón, encontrando que la cinética de concentración de la misma es independiente de la susceptibilidad de la cepa de *P. aeruginosa* estudiada. En los animales inoculados con mucina porcina, se observó que la concentración de IL-22 aumentó a las 4 horas en comparación a animales no inoculados, disminuyendo a partir de las 6 horas en

Discusión

adelante. La IL-22, es un miembro de la familia de IL-10 (183), la cual interviene en diversas funciones como en reforzar las defensas inmunes innatas de las células epiteliales (237, 238), contribuir a la integridad de la barrera epitelial del pulmón (239), ayudar en la reparación tisular (183) y participar en el reclutamiento de neutrófilos. Existen numerosos estudios que demuestran que puede promover la inflamación y autodestrucción de los tejidos (240) y su papel en la fisiopatología de varias enfermedades inflamatorias, punto que se confirmó en nuestro estudio, en el que encontramos a las 4 horas de la inoculación, daño pulmonar que coincidía con el aumento de los niveles de IL-22. Una hipótesis, podría ser que IL-22 es el único miembro de la familia IL10 que puede interactuar con el receptor soluble, IL22-BP, altamente expresado en los pulmones (183). IL-22 BP, podría estar implicado en la regulación de IL-22 en la neumonía bacteriana, siendo crítica la regulación del sistema IL-22/IL-22BP en estay evitar efectos inflamatorios nocivos (183, 240). Contrariamente a lo que observamos en nuestro estudio, el trabajo de Broquet *et al.*, demostró que los niveles de IL-22 estaban correlacionados negativamente con el reclutamiento de neutrófilos en la neumonía experimental causada por *P. aeruginosa* (183). En otro estudios llevado a cabo por Bayer *et al.*, en el que observaron que la ausencia de IL-22 no producía diferencias significativas en la mortalidad aguda, la carga bacteriana, las tasas de infección crónica, los cambios histológicos o la inflamación neutrofílica (241).

Finalmente, en este capítulo comprobamos que la mucina porcina, es una fuente de nutriente para las cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, facilitando el crecimiento bacteriano independientemente de la susceptibilidad de éstas a colistina. Estos resultados son congruentes con los descritos por Panayioti-Aristoteli *et al.*, en los que indicaron un aumento del crecimiento en cepas de *P. aeruginosa in vitro* que utilizaban junto a mucina porcina (227). Igualmente, existen otros estudios que demuestran que la mucina porcina induce cambios en la expresión de genes, mejora la formación de biofilm y/o promueve la capacidad de exhibir una motilidad superficial rápida (242). Estos efectos detallados que provoca la mucina, han sido observados también en cepas de *A. baumannii*. En este contexto, el trabajo de Ohneck *et al.*, demostró que *A. baumannii* reconocía a la mucina porcina como señal ambiental, lo que desencadenaba una cascada de respuestas que permitía que este patógeno fuese capaz de adquirir nutrientes y promoviese interacciones huésped-patógeno y la expresión diferencial de

Discusión

genes asociados a la virulencia (48). Aunque, como se ha mencionado anteriormente, la mucina ayuda a la inmunidad innata del huésped, Sin embargo, hay que mencionar que los patógenos poseen mecanismos que les ayudan a evadir las propiedades protectoras de la mucina (243), observándose que tiene la capacidad de unirse a antibióticos, como la colistina, reduciendo la eficacia de estos (243).

En resumen, en el presente capítulo, se muestra la capacidad de los neutrófilos y macrófagos en controlar y resolver infecciones no letales en cuestión de horas. Además, la caracterización de modelos de neumonía experimental no letales pueden ser útiles para estudios de inmunoterapia pasiva como adyuvante a antibióticos. Finalmente, los resultados de los estudios con mucina porcina, demuestran que afectan la respuesta celular inmune desencadenada por *P. aeruginosa*, provocando daños tisulares y siendo fuente de nutrientes, ayudando por tanto al crecimiento bacteriano.

CAPÍTULO 2: Eficacia de las células de memoria en modelos letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*

Como se ha descrito previamente en la introducción del presente trabajo, no existen estudios que evalúen tratamientos mediante transferencia adoptiva de linfocitos de memoria frente a infecciones por bacilos Gram-negativos no fermentadores. En esta línea, surge la posibilidad de evaluar la eficacia del tratamiento con linfocitos de memoria en la neumonía experimental murina causada por cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* y de *P. aeruginosa* con distinto patrón de susceptibilidad a colistina.

El problema de salud mundial causado por infecciones por bacilos Gram-negativos multirresistentes, junto al crecimiento exponencial de resistencias antimicrobianas, reducen las opciones de tratamiento, lo que ha provocado que la OMS alerte sobre la necesidad urgente de búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas (10). En este trabajo, abordamos esta necesidad a través del análisis de la inmunoterapia como coadyuvante al tratamiento con antimicrobianos. Existen numerosos estudios, que han probado su eficacia en el tratamiento de otras bacterias, de infecciones virales o del tratamiento del cáncer (244-246).. El estudio de Contreras *et al.*, demostró, en un modelo experimental de melanoma, que el tratamiento con linfocitos de memoria T CD8 es más eficaz que con linfocitos T CD8 efectores. Igualmente, sugirieron que la combinación de ambos tipos celulares podría ser una manera de optimizar la eficacia de la inmunoterapia adoptiva (246). Además, recientemente, el trabajo de Khan *et al.*, demostró en un caso clínico en un paciente con melanoma con primario desconocido, que el tratamiento adyuvante con inmunoterapia combinada fue eficaz (247).

En este trabajo, analizamos la eficacia del tratamiento con linfocitos de memoria T CD8 en la neumonía experimental murina causada por cepas clínicas multirresistentes de *A. baumannii* (Ab CS01, sensible a colistina y Ab CR17, resistente a colistina, y se comparó con antimicrobianos que se usan actualmente en el tratamiento de estas infecciones en la clínica. Los resultados obtenidos del tratamiento con una única dosis intravenosa de linfocitos de memoria T CD8 redujeron la concentración bacteriana en pulmón y sangre, al igual que redujeron el porcentaje de mortalidad y bacteriemia frente a la cepa de *A. baumannii* sensible a colistina frente a los animales controles, siendo

Discusión

igual de eficaz que la monoterapia con sulbactam a dosis que alcanzan la diana terapéutica. De la misma manera el tratamiento con una dosis intravenosa de linfocitos de memoria T CD8, redujo la concentración bacteriana en pulmón y sangre frente a la cepa de *A. baumannii* resistente a colistina, siendo su eficacia similar a la encontrada con la monoterapia con tigeciclina. Esta eficacia del tratamiento mediante transferencia de linfocitos T fue observada en un modelo de infección intratraqueal en ratas por *P. aeruginosa*, Dunkley *et al.*, mostraron que los animales tratados con linfocitos T CD4 presentaban un mayor aclaramiento bacteriano en las vías respiratorias (248). También, existen diversos estudios en *Bordetella pertussis* (244) o *Chlamydia trachomatis* (249), que muestran el papel protector de linfocitos de memoria T CD4 residentes en los tejidos. Sin embargo, el tratamiento con sulbactam en monoterapia fue el más eficaz frente a la cepa de *A. baumannii* resistente a colistina. Existen estudios que observan que el tratamiento con sulbactam o tigeciclina muestran actividad *in vivo* contra un amplio espectro de cepas MR de *A. baumannii* (250-252). También, se ha observado que a pesar de que en la mayoría de los estudios de *A. baumannii*, el tratamiento de sulbactam se usa en combinación con ampicilina, esta asociación no es necesaria dado que la actividad se debe exclusivamente a sulbactam (253).

Igualmente, en este trabajo estudiamos la eficacia del tratamiento con linfocitos de memoria B en la neumonía experimental murina causada por cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa* (Pa 147, sensible a colistina y Pa M1, resistente a colistina), y se comparó con antimicrobianos que se usan actualmente en el tratamiento de estas infecciones. Los resultados demostraron que el tratamiento con una única dosis intravenosa de linfocitos de memoria B, redujo la concentración bacteriana en pulmón y sangre y disminuyó el porcentaje de bacteriemia y mortalidad frente a los animales controles, y siendo similar a los resultados obtenidos con ceftazidima en monoterapia a dosis que alcanzan los parámetros farmacodinámicos óptimos. El estudio de Hoyt *et al.*, en un modelo de neumonía experimental por *Pneumocystis*, demostró que la transferencia de linfocitos B protegía la actividad progenitora hematopoyética y complementaban el papel modulador de los IFN tipo I para prevenir complicaciones sistémicas (254). Además, en un modelo de infección por citomegalovirus en ratones publicado por Klenovsek *et al.*, se observó que los linfocitos de memoria B eran eficaces en proteger de la infección (255). Por otro lado, a pesar de que la cepa era sensible a colistina, la monoterapia con este antimicrobiano a dosis

Discusión

farmacodinámicas óptimas, no fue eficaz en la disminución de la concentración bacteriana en pulmón, o de la reducción de mortalidad. Los buenos resultados obtenidos con ceftazidima, se han descrito en otros estudios frente a infecciones causados por este tipo de patógeno. En este sentido, Tanya *et al.*, propusieron el uso de ceftazidima o piperacilina-tazobactam frente a el uso de carbapenémicos en el tratamiento de bacteriemias causadas por *P. aeruginosa* (256). Sin embargo, cuando evaluamos el tratamiento de la neumonía experimental causada por la cepa clínica multirresistente de *P. aeruginosa* resistente a colistina, el tratamiento con una dosis de células de memoria B, al igual que sucedió con el tratamiento con colistina y ceftazidima a dosis óptimas, solo redujo la concentración bacteriana en sangre y la mortalidad.

La colistina, y a pesar del riesgo que supone su tratamiento en cuanto a posibles nefro- y neuro-toxicidades (54-56) es actualmente el último recurso en el tratamiento de infecciones por bacilos Gram-negativos. Sin embargo y cómo sucede en nuestro trabajo, existen numerosos estudios que han demostrado la no mejor eficacia de colistina frente a infecciones causadas por cepas de *P. aeruginosa*. No obstante, existen trabajos como el de Kazmierczak *et al.*, que concluye que el tratamiento con colistina fue el más activo con tasas de susceptibilidad del 99,6% frente a cepas de *P. aeruginosa* (257)

En conclusión, este estudio ha demostrado que la transferencia adoptiva con linfocitos de memoria como adyuvante a antimicrobianos, podría ser una buena alternativa terapéutica en el tratamiento de infecciones causadas por este tipo de patógenos. Esta hipótesis ha de confirmarse en nuevos estudios en que se evalúe la eficacia de la combinación del tratamiento con linfocitos de memoria junto a antimicrobianos.

CAPÍTULO 3: Eficacia de la inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas en IgM en modelos letales de neumonía experimental causada por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*

Como hemos comentado anteriormente, existe una necesidad urgente de buscar alternativas terapéuticas frente a infecciones causadas por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*. La inmunoterapia pasiva, podría ser uno de los enfoques más prometedores en este sentido (201). En esta línea, nos planteamos evaluar la eficacia del tratamiento con una preparación comercial de inmunoglobulinas enriquecidas en IgM, en monoterapia y en combinación con antimicrobianos, frente a la neumonía experimental causada por cepas clínicas multirresistentes de *P. aeruginosa*. Es conocido que la IgM, juega un papel fundamental en la respuesta inicial frente a una infección y que su estructura pentamérica posee una eficacia mayor que la IgG en la neutralización de toxinas y la aglutinación bacteriana por este motivo, la producción de una IgIV enriquecidas en IgM podría ofrecer la ventaja de una protección inmune contra las infecciones bacterianas (201, 211). El estudio de Itoh *et al.*, demostró que el tratamiento con IgIV promueve la actividad bactericida de neutrófilos a través de la fagocitosis de cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* multirresistentes (210). También, existen estudios que indican el efecto protector de IgIV frente a infecciones por *P. aeruginosa* (258). Además, se probó la mayor eficacia de estas IgIV enriquecidas en IgM en comparación con IgIV estándar (211). Conjuntamente, hay estudios que demuestran que el tratamiento con IgIV enriquecidas en IgM fue eficaz como terapia complementaria en pacientes con sepsis o el shock séptico (215, 259, 260). Además, recientemente, el trabajo de kukic *et al.*, demostró en un caso clínico en un paciente con sepsis, que el uso de IgIV enriquecidas con IgM fue eficaz como terapia adyuvante (216). Estos trabajos son concordantes con los resultados de nuestro trabajo, en los que el tratamiento combinado de IgIV enriquecidas en IgM, disminuyó la concentración bacteriana en pulmón y sangre así como la mortalidad en la neumonía causada por la cepa multirresistente de *P. aeruginosa* sensible a colistina, mejorando el tratamiento con colistinay ceftazidima en monoterapia, a pesar de que ambos antimicrobianos eran activos para esta cepa y se usaron dosis optimizadas. Igualmente, cuando se analizó la combinación de IgIV enriquecidas en IgM en combinación con colistina y ceftazidima en la cepa de *P. aeruginosa* resistente a colistina, observamos que redujo la concentración bacteriana en pulmón y sangre tanto comparándolo con los animales

Discusión

controles como con los antimicrobianos en monoterapia. De manera similar a nuestros resultados, Yavuz *et al.*, observaron que la combinación de antibióticos convencionales con IgIV enriquecidas con IgM mejoró las condiciones clínicas generales y redujo significativamente la tasa de mortalidad en pacientes con síndrome de disfunción orgánica múltiple inducida por sepsis (261). También se ha visto que las terapias de combinación que incluyen colistina o ceftazidima mostraron una gran eficacia antimicrobiana contra patógenos gran-negativos (262, 263). Contradictoriamente, está el trabajo de Tugrul *et al.*, que no encontró este efecto positivo sobre la morbi-mortalidad, ni sobre la incidencia del shock séptico en pacientes con sepsis por (264). Este resultado, podría deberse a cómo sucede con el tratamiento con antimicrobianos, que la eficiencia del tratamiento de estas preparaciones de IgIV dependiese del inicio temprano del mismo (201).

Además, hay estudios que sugieren que el efecto de la IgM, puede encontrarse no solo dirigido a patógenos bacterianos, sino también influir en la respuesta antiinflamatoria (265). Igualmente, podemos encontrar estudios experimentales de neumonía causada por *P. aeruginosa*, como el realizado por Thomsen *et al.*, que analizaron la eficacia de otras inmunoglobulinas, como la IgY, que demuestran que la profilaxis con IgY redujo la concentración bacteriana y moderaba la inflamación, sugiriendo que la administración de IgY podría servir como coadyuvante a antimicrobianos en la prevención de la colonización temprana de este patógeno (266). Igualmente, se ha probado en un modelo de neumonía murina por cepas multirresistentes de *A. baumannii*, la eficacia de esta inmunoglobulina IgY, en la disminución de la mortalidad y del daño tisular en pulmones frente a infecciones (267, 268).

Por tanto y en conclusión, creemos que la inmunoterapia pasiva mediante el tratamiento combinado de IgIV enriquecido en IgM a antimicrobianos puede ser una buena opción para el tratamiento de infecciones causadas por cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*.

Discusión

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. El modelo de neumonía experimental no letal caracterizado, produce una elevada concentración bacteriana en pulmón a pesar de que la supervivencia es del 100%, independientemente de la cepa usada.
2. Los neutrófilos y macrófagos controlan precozmente la multiplicación bacteriana en la neumonía causada por bacilos Gram-negativos no fermentadores.
3. La mucina porcina despierta por sí sola la respuesta celular innata.
4. El tratamiento con una única dosis de linfocitos T CD8 de memoria es eficaz en el modelo de neumonía experimental letal causado por *A. baumannii* sensible o resistente a colistina, reduciendo la carga bacteriana y la mortalidad.
5. El tratamiento con una única dosis linfocitos T CD8 de memoria es igual de eficaz que el tratamiento con sulbactam y tigeciclina, en el modelo de neumonía experimental letal por *A. baumannii* sensible y resistente a colistina, respectivamente.
6. El tratamiento con una única dosis de linfocitos B de memoria es eficaz en el modelo de neumonía experimental letal causado por *P. aeruginosa* sensible y resistente a colistina, reduciendo la mortalidad.
7. El tratamiento con una única dosis de linfocitos B de memoria es igual de eficaz que el tratamiento con ceftazidima en el modelo de neumonía experimental letal por *P. aeruginosa* sensible a colistina.
8. El tratamiento combinado de inmunoglobulinas intravenosas enriquecidas en IgM con colistina o ceftazidima es eficaz en el modelo de neumonía experimental letal causado por *P. aeruginosa* sensible o resistente a colistina, reduciendo la carga bacteriana y la mortalidad.
9. Los resultados del presente estudio sugieren que la inmunoterapia con linfocitos de memoria y/o inmunoglobulinas enriquecidas en IgM pueden ser una opción terapéutica, en combinación con antimicrobianos, para el tratamiento de neumonías causadas por cepas de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*.

REFERENCIAS

Referencias

Referencias

1. Bassetti M, Peghin M, Vena A, Giacobbe DR. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Frontiers in medicine*. 2019;6:74.
2. Du D, Wang-Kan X, Neuberger A, van Veen HW, Pos KM, Piddock LJV, et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature reviews Microbiology*. 2018;16(9):523-39.
3. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *The Journal of infectious diseases*. 2008;197(8):1079-81.
4. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;48(1):1-12.
5. Usjak D, Ivkovic B, Bozic DD, Boskovic L, Milenkovic M. Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*. 2019;131:186-96.
6. Moore LS, Freeman R, Gilchrist MJ, Gharbi M, Brannigan ET, Donaldson H, et al. Homogeneity of antimicrobial policy, yet heterogeneity of antimicrobial resistance: antimicrobial non-susceptibility among 108,717 clinical isolates from primary, secondary and tertiary care patients in London. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(12):3409-22.
7. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *The New England journal of medicine*. 2010;362(19):1804-13.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report Antimicrobial Resistance and Healthcare Associated Infections. 2014.
9. Chopra I, Schofield C, Everett M, O'Neill A, Miller K, Wilcox M, et al. Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. *The Lancet Infectious diseases*. 2008;8(2):133-9.
10. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious diseases*. 2018;18(3):318-27.

Referencias

11. Hauser AR, Meccas J, Moir DT. Beyond Antibiotics: New Therapeutic Approaches for Bacterial Infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2016;63(1):89-95.
12. Rex JH, Fernandez Lynch H, Cohen IG, Darrow JJ, Outterson K. Designing development programs for non-traditional antibacterial agents. *Nature communications*. 2019;10(1):3416.
13. Cisneros JM, Ortiz-Leyba C, Lepe JA, Obando I, Conde M, Cayuela A, et al. [Prudent use of antibiotics and suggestions for improvement from hospital-based medicine]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*. 2010;28 Suppl 4:28-31.
14. Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA, Pantapalangkoor P, Luna B, Spellberg B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. *Clinical microbiology reviews*. 2017;30(1):409-47.
15. Hirai Y. Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection. *The Journal of hospital infection*. 1991;19(3):191-200.
16. Henriksen SD. *Moraxella*, *Acinetobacter*, and the *Mimeae*. *Bacteriological reviews*. 1973;37(4):522-61.
17. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(3):538-82.
18. Lin MF, Lan CY. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World journal of clinical cases*. 2014;2(12):787-814.
19. Vincent JL, Rello J, Marshall J, Silva E, Anzueto A, Martin CD, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama*. 2009;302(21):2323-9.
20. Cascio A, Conti A, Sinardi L, Iaria C, Angileri FF, Stassi G, et al. Post-neurosurgical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis successfully treated with intrathecal colistin. A new case and a systematic review of the literature. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2010;14(7):e572-9.
21. Bhagan-Bruno S, Lather N, Fergus IV. *Acinetobacter* endocarditis presenting as a large right atrial mass: an atypical presentation. *Echocardiography*. 2010;27(4):E39-42.
22. Manchanda V, Sanchaita S, Singh N. Multidrug resistant *Acinetobacter*. *Journal of global infectious diseases*. 2010;2(3):291-304.

Referencias

23. Lee CR, Lee JH, Park M, Park KS, Bae IK, Kim YB, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:55.
24. McConnell MJ, Actis L, Pachon J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS microbiology reviews*. 2013;37(2):130-55.
25. Gordon NC, Wareham DW. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(3):219-26.
26. Kim YJ, Kim SI, Kim YR, Hong KW, Wie SH, Park YJ, et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: diversity of resistant mechanisms and risk factors for infection. *Epidemiology and infection*. 2012;140(1):137-45.
27. Tayabali AF, Nguyen KC, Shwed PS, Crosthwait J, Coleman G, Seligy VL. Comparison of the virulence potential of *Acinetobacter* strains from clinical and environmental sources. *PloS one*. 2012;7(5):e37024.
28. Chusri S, Chongsuvivatwong V, Rivera JI, Silpapojakul K, Singkhamanan K, McNeil E, et al. Clinical outcomes of hospital-acquired infection with *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(7):4172-9.
29. de Breij A, Eveillard M, Dijkshoorn L, van den Broek PJ, Nibbering PH, Joly-Guillou ML. Differences in *Acinetobacter baumannii* strains and host innate immune response determine morbidity and mortality in experimental pneumonia. *PloS one*. 2012;7(2):e30673.
30. Nowak P, Paluchowska P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2016;54(2):61-74.
31. Pachori P, Gothalwal R, Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. *Genes & diseases*. 2019;6(2):109-19.
32. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*. 2013;67(3):159-73.
33. Pagani L, Afshari A, Harbarth S. Year in review 2010: Critical Care--Infection. *Critical care*. 2011;15(6):238.

Referencias

34. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection control and hospital epidemiology*. 2008;29(11):996-1011.
35. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Reviews of infectious diseases*. 1983;5(2):279-313.
36. Lu Q, Eggimann P, Luyt CE, Wolff M, Tamm M, Francois B, et al. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Critical care*. 2014;18(1):R17.
37. Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(11):4733-8.
38. Rello J, Allegri C, Rodriguez A, Vidaur L, Sirgo G, Gomez F, et al. Risk factors for ventilator-associated pneumonia by *Pseudomonas aeruginosa* in presence of recent antibiotic exposure. *Anesthesiology*. 2006;105(4):709-14.
39. Oie S, Fukui Y, Yamamoto M, Masuda Y, Kamiya A. In vitro antimicrobial effects of aztreonam, colistin, and the 3-drug combination of aztreonam, ceftazidime and amikacin on metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC infectious diseases*. 2009;9:123.
40. Honore N, Nicolas MH, Cole ST. Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of a membrane-bound sensory transducer. *Molecular microbiology*. 1989;3(8):1121-30.
41. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet). 2017.
42. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2017;7:39.
43. Palmer GC, Whiteley M. Metabolism and Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in the Lungs of Individuals with Cystic Fibrosis. *Microbiology spectrum*. 2015;3(4).

Referencias

44. Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(22):8487-92.
45. Hogardt M, Heesemann J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2010;300(8):557-62.
46. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2005;171(11):1209-23.
47. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et maladies infectieuses*. 2006;36(2):78-91.
48. Ohneck EJ, Arivett BA, Fiester SE, Wood CR, Metz ML, Simeone GM, et al. Mucin acts as a nutrient source and a signal for the differential expression of genes coding for cellular processes and virulence factors in *Acinetobacter baumannii*. *PloS one*. 2018;13(1):e0190599.
49. Sanchez A, Gattarello S, Rello J. New treatment options for infections caused by multiresistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2011;32(2):151-8.
50. Castanheira M, Mendes RE, Jones RN. Update on *Acinetobacter* species: mechanisms of antimicrobial resistance and contemporary *in vitro* activity of minocycline and other treatment options. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2014;59 Suppl 6:S367-73.
51. Viehman JA, Nguyen MH, Doi Y. Treatment options for carbapenem-resistant and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *Drugs*. 2014;74(12):1315-33.
52. Voulgaris GL, Voulgari ML, Falagas ME. Developments on antibiotics for multidrug resistant bacterial Gram-negative infections. *Expert review of anti-infective therapy*. 2019;17(6):387-401.
53. Fish DN, Choi MK, Jung R. Synergic activity of cephalosporins plus fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* with resistance to one or both drugs. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2002;50(6):1045-9.

Referencias

54. De Pascale G, Pompucci A, Maviglia R, Spanu T, Bello G, Mangiola A, et al. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventriculitis with intrathecal and intravenous colistin. *Minerva anesthesiologica*. 2010;76(11):957-60.
55. Akers KS, Rowan MP, Niece KL, Stewart IJ, Mende K, Cota JM, et al. Colistin pharmacokinetics in burn patients during continuous venovenous hemofiltration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(1):46-52.
56. Krajewski J, Bode-Boger SM, Troger U, Martens-Lobenhoffer J, Mulrooney T, Mittelstadt H, et al. Successful treatment of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* osteomyelitis using a colistin- and tobramycin-impregnated PMMA spacer. *International journal of antimicrobial agents*. 2014;44(4):363-6.
57. Cerceo E, Deitelzweig SB, Sherman BM, Amin AN. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections in the Hospital Setting: Overview, Implications for Clinical Practice, and Emerging Treatment Options. *Microbial drug resistance*. 2016;22(5):412-31.
58. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(2):161-8.
59. Kluytmans J. Plasmid-encoded colistin resistance: mcr-one, two, three and counting. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2017;22(31).
60. Martins-Sorenson N, Snesrud E, Xavier DE, Cacci LC, Iavarone AT, McGann P, et al. A novel plasmid-encoded mcr-4.3 gene in a colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2019.
61. Meunier D, Woodford N, Hopkins KL. Evaluation of the AusDiagnostics MT CRE EU assay for the detection of carbapenemase genes and transferable colistin resistance determinants mcr-1/-2 in MDR Gram-negative bacteria. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(12):3355-8.
62. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(3):450-70.
63. Milatovic D, Braveny I. Development of resistance during antibiotic therapy. *European journal of clinical microbiology*. 1987;6(3):234-44.

Referencias

64. Tangden T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Upsala journal of medical sciences*. 2014;119(2):149-53.
65. Rahal JJ. Antimicrobial resistance among and therapeutic options against gram-negative pathogens. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49 Suppl 1:S4-S10.
66. Tangden T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerback P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by in vitro time-kill experiments. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(3):1757-62.
67. Urban C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(6):2732-4.
68. Morelli P, Ferrario A, Tordato F, Piazza A, Casari E. Successful treatment of post-neurosurgical multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* meningo-encephalitis with combination therapy of colistin, rifampicin and doripenem. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(3):857-9.
69. Cai Y, Chai D, Wang R, Liang B, Bai N. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(7):1607-15.
70. Park GC, Choi JA, Jang SJ, Jeong SH, Kim CM, Choi IS, et al. In Vitro Interactions of Antibiotic Combinations of Colistin, Tigecycline, and Doripenem Against Extensively Drug-Resistant and Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Annals of laboratory medicine*. 2016;36(2):124-30.
71. Principe L, D'Arezzo S, Capone A, Petrosillo N, Visca P. *In vitro* activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2009;8:18.
72. Rodriguez CH, De Ambrosio A, Bajuk M, Spinozzi M, Nastro M, Bombicino K, et al. In vitro antimicrobials activity against endemic *Acinetobacter baumannii* multiresistant clones. *Journal of infection in developing countries*. 2010;4(3):164-7.
73. Pachon-Ibanez ME, Docobo-Perez F, Lopez-Rojas R, Dominguez-Herrera J, Jimenez-Mejias ME, Garcia-Curiel A, et al. Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by

Referencias

- imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2010;54(3):1165-72.
74. Dassner AM, Sutherland C, Girotto J, Nicolau DP. In vitro Activity of Ceftolozane/Tazobactam Alone or with an Aminoglycoside Against Multi-Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Pediatric Cystic Fibrosis Patients. Infectious diseases and therapy. 2017;6(1):129-36.
75. Safdar N, Handelsman J, Maki DG. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis. The Lancet Infectious diseases. 2004;4(8):519-27.
76. Wright H, Bonomo RA, Paterson DL. New agents for the treatment of infections with Gram-negative bacteria: restoring the miracle or false dawn? Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2017;23(10):704-12.
77. Theuretzbacher U. Antibiotic innovation for future public health needs. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2017;23(10):713-7.
78. Czaplewski L, Bax R, Clokie M, Dawson M, Fairhead H, Fischetti VA, et al. Alternatives to antibiotics-a pipeline portfolio review. The Lancet Infectious diseases. 2016;16(2):239-51.
79. Hincapie O, Giraldo P, Orduz S. In silico design of polycationic antimicrobial peptides active against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Antonie van Leeuwenhoek. 2018;111(10):1871-82.
80. Garcia-Quintanilla M, Pulido MR, Lopez-Rojas R, Pachon J, McConnell MJ. Emerging therapies for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. Trends in microbiology. 2013;21(3):157-63.
81. Conlon JM. Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2011;68(13):2303-15.
82. Conlon JM, Sonnevend A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. Methods in molecular biology. 2010;618:3-14.
83. Yeung AT, Gellatly SL, Hancock RE. Multifunctional cationic host defence peptides and their clinical applications. Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2011;68(13):2161-76.

Referencias

84. Nijnik A, Hancock R. Host defence peptides: antimicrobial and immunomodulatory activity and potential applications for tackling antibiotic-resistant infections. *Emerging health threats journal*. 2009;2:e1.
85. Maisetta G, Batoni G, Esin S, Florio W, Bottai D, Favilli F, et al. *In vitro* bactericidal activity of human beta-defensin 3 against multidrug-resistant nosocomial strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(2):806-9.
86. Routsias JG, Karagounis P, Parvulesku G, Legakis NJ, Tsakris A. *In vitro* bactericidal activity of human beta-defensin 2 against nosocomial strains. *Peptides*. 2010;31(9):1654-60.
87. Feng Z, Jia X, Adams MD, Ghosh SK, Bonomo RA, Weinberg A. Epithelial innate immune response to *Acinetobacter baumannii* challenge. *Infection and immunity*. 2014;82(11):4458-65.
88. Supp DM, Gardner J, Klingenberg JM, Neely AN. Antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* does not impact sensitivity to human beta defensin 4. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 2009;35(7):949-55.
89. Garcia-Quintanilla M, Pulido MR, Moreno-Martinez P, Martin-Pena R, Lopez-Rojas R, Pachon J, et al. Activity of host antimicrobials against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* acquiring colistin resistance through loss of lipopolysaccharide. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(5):2972-5.
90. Feng X, Sambanthamoorthy K, Palys T, Parnavitana C. The human antimicrobial peptide LL-37 and its fragments possess both antimicrobial and antibiofilm activities against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Peptides*. 2013;49:131-7.
91. Batoni G, Maisetta G, Esin S. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1858(5):1044-60.
92. LaVergne S, Hamilton T, Biswas B, Kumaraswamy M, Schooley RT, Wooten D. Phage Therapy for a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Craniectomy Site Infection. *Open forum infectious diseases*. 2018;5(4):ofy064.
93. Carlton RM. Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. 1999;47(5):267-74.
94. Merrill CR, Scholl D, Adhya SL. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature reviews Drug discovery*. 2003;2(6):489-97.

Referencias

95. Summers WC. Bacteriophage therapy. Annual review of microbiology. 2001;55:437-51.
96. Defraigne V, Schuermans J, Grymonprez B, Govers SK, Aertsen A, Fauvart M, et al. Efficacy of Artilylin Art-175 against Resistant and Persistent *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2016;60(6):3480-8.
97. Kwiatek M, Mizak L, Parasion S, Gryko R, Olender A, Niemcewicz M. Characterization of five newly isolated bacteriophages active against *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. Folia microbiologica. 2015;60(1):7-14.
98. Pachon-Ibanez ME, Smani Y, Pachon J. Use of adjuvants in the treatment of *Acinetobacter baumannii*. Expert review of anti-infective therapy. 2016;14(2):153-5.
99. Smani Y, Pachon-Ibanez ME, Pachon J. New molecules and adjuvants in the treatment of infections by *Acinetobacter baumannii*. Expert opinion on pharmacotherapy. 2016;17(9):1207-14.
100. Smani Y, Dominguez-Herrera J, Ibanez-Martinez J, Pachon J. Therapeutic efficacy of lysophosphatidylcholine in severe infections caused by *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2015;59(7):3920-4.
101. Vila-Farres X, Parra-Millan R, Sanchez-Encinales V, Varese M, Ayerbe-Algaba R, Bayo N, et al. Combating virulence of Gram-negative bacilli by OmpA inhibition. Scientific reports. 2017;7(1):14683.
102. Ulevitch RJ. Therapeutics targeting the innate immune system. Nature reviews Immunology. 2004;4(7):512-20.
103. Hamill P, Brown K, Jenssen H, Hancock RE. Novel anti-infectives: is host defence the answer? Current opinion in biotechnology. 2008;19(6):628-36.
104. Hancock RE, Nijnik A, Philpott DJ. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. Nature reviews Microbiology. 2012;10(4):243-54.
105. Yang YF, Zhao W, Xia HM, Zhong YD, Huang P, Wen J. Long-term efficacy of interferon alpha therapy on hepatitis B viral replication in patients with chronic hepatitis B: a meta-analysis. Antiviral research. 2010;85(2):361-5.
106. Chiang MH, Sung WC, Lien SP, Chen YZ, Lo AF, Huang JH, et al. Identification of novel vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii* using reverse vaccinology. Human vaccines & immunotherapeutics. 2015;11(4):1065-73.
107. Shu MH, MatRahim N, NorAmdan N, Pang SP, Hashim SH, Phoon WH, et al. An Inactivated Antibiotic-Exposed Whole-Cell Vaccine Enhances Bactericidal

Referencias

- Activities Against Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Scientific reports. 2016;6:22332.
108. Cabral MP, Garcia P, Beceiro A, Rumbo C, Perez A, Moscoso M, et al. Design of live attenuated bacterial vaccines based on D-glutamate auxotrophy. Nature communications. 2017;8:15480.
109. Lei L, Yang F, Zou J, Jing H, Zhang J, Xu W, et al. DNA vaccine encoding OmpA and Pal from *Acinetobacter baumannii* efficiently protects mice against pulmonary infection. Molecular biology reports. 2019.
110. Garcia-Quintanilla M, Pulido MR, Pachon J, McConnell MJ. Immunization with lipopolysaccharide-deficient whole cells provides protective immunity in an experimental mouse model of *Acinetobacter baumannii* infection. PloS one. 2014;9(12):e114410.
111. Singh R, Garg N, Shukla G, Capalash N, Sharma P. Immunoprotective Efficacy of *Acinetobacter baumannii* Outer Membrane Protein, FilF, Predicted In silico as a Potential Vaccine Candidate. Frontiers in microbiology. 2016;7:158.
112. Jiang XR, Song A, Bergelson S, Arroll T, Parekh B, May K, et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. Nature reviews Drug discovery. 2011;10(2):101-11.
113. Breedveld FC. Therapeutic monoclonal antibodies. Lancet. 2000;355(9205):735-40.
114. Desgranges C. [Monoclonal antibodies and therapeutics]. Pathologie-biologie. 2004;52(6):351-64.
115. Buchwald UK, Pirofski L. Immune therapy for infectious diseases at the dawn of the 21st century: the past, present and future role of antibody therapy, therapeutic vaccination and biological response modifiers. Current pharmaceutical design. 2003;9(12):945-68.
116. Casadevall A, Dadachova E, Pirofski LA. Passive antibody therapy for infectious diseases. Nature reviews Microbiology. 2004;2(9):695-703.
117. Hey A. History and Practice: Antibodies in Infectious Diseases. Microbiology spectrum. 2015;3(2):AID-0026-2014.
118. ter Meulen J. Monoclonal antibodies for prophylaxis and therapy of infectious diseases. Expert opinion on emerging drugs. 2007;12(4):525-40.
119. Nielsen TB, Pantapalangkoor P, Luna BM, Bruhn KW, Yan J, Dekitani K, et al. Monoclonal Antibody Protects Against *Acinetobacter baumannii* Infection by

Referencias

- Enhancing Bacterial Clearance and Evading Sepsis. *The Journal of infectious diseases*. 2017;216(4):489-501.
120. Garcia-Patino MG, Garcia-Contreras R, Licona-Limon P. The Immune Response against *Acinetobacter baumannii*, an Emerging Pathogen in Nosocomial Infections. *Frontiers in immunology*. 2017;8:441.
121. J. Larry Jameson ASF, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, Joseph Loscalzo. Harrison. *Principios de Medicina Interna*, 20e. 2019.
122. Sattler S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. *Advances in experimental medicine and biology*. 2017;1003:3-14.
123. Farber DL, Netea MG, Radbruch A, Rajewsky K, Zinkernagel RM. Immunological memory: lessons from the past and a look to the future. *Nature reviews Immunology*. 2016;16(2):124-8.
124. Aliberti J. *Control of Innate and Adaptive Immune Responses during Infectious Disease*. Springer. 2011.
125. Netea MG, Balkwill F, Chonchol M, Cominelli F, Donath MY, Giamarellos-Bourboulis EJ, et al. A guiding map for inflammation. *Nature immunology*. 2017;18(8):826-31.
126. Netea MG, Schlitzer A, Placek K, Joosten LAB, Schultze JL. Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell host & microbe*. 2019;25(1):13-26.
127. Nicholson LB. The immune system. *Essays in biochemistry*. 2016;60(3):275-301.
128. Simon AK, Hollander GA, McMichael A. Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proceedings Biological sciences*. 2015;282(1821):20143085.
129. Gasteiger G, D'Osualdo A, Schubert DA, Weber A, Bruscia EM, Hartl D. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *Journal of innate immunity*. 2017;9(2):111-25.
130. Thaïss CA, Zmora N, Levy M, Elinav E. The microbiome and innate immunity. *Nature*. 2016;535(7610):65-74.
131. Degn SE, Thiel S. Humoral pattern recognition and the complement system. *Scandinavian journal of immunology*. 2013;78(2):181-93.

Referencias

132. de Cordoba SR, Tortajada A, Harris CL, Morgan BP. Complement dysregulation and disease: from genes and proteins to diagnostics and drugs. *Immunobiology*. 2012;217(11):1034-46.
133. Carroll MC, Isenman DE. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity*. 2012;37(2):199-207.
134. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015;7(5).
135. Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annual review of immunology*. 2014;32:659-702.
136. Malhotra S, Hayes D, Jr., Wozniak DJ. Cystic Fibrosis and *Pseudomonas aeruginosa*: the Host-Microbe Interface. *Clinical microbiology reviews*. 2019;32(3).
137. Tsuchiya T, Nakao N, Yamamoto S, Hirai Y, Miyamoto K, Tsujibo H. NK1.1(+) cells regulate neutrophil migration in mice with *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *Microbiology and immunology*. 2012;56(2):107-16.
138. Bruhn KW, Pantapalangkoor P, Nielsen T, Tan B, Junus J, Hujer KM, et al. Host fate is rapidly determined by innate effector-microbial interactions during *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *The Journal of infectious diseases*. 2015;211(8):1296-305.
139. Grguric-Smith LM, Lee HH, Gandhi JA, Brennan MB, DeLeon-Rodriguez CM, Coelho C, et al. Neutropenia exacerbates infection by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in a murine wound model. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:1134.
140. Karim M, Khan W, Farooqi B, Malik I. Bacterial isolates in neutropenic febrile patients. *JPMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 1991;41(2):35-7.
141. Qiu H, KuoLee R, Harris G, Van Rooijen N, Patel GB, Chen W. Role of macrophages in early host resistance to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection. *PloS one*. 2012;7(6):e40019.
142. Bhuiyan MS, Ellett F, Murray GL, Kostoulas X, Cerqueira GM, Schulze KE, et al. *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(34):9599-604.
143. Pires S, Parker D. Innate Immune Responses to *Acinetobacter baumannii* in the Airway. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2019.

Referencias

144. Pires S, Parker D. Innate Immune Responses to *Acinetobacter baumannii* in the Airway. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*. 2019;39(8):441-9.
145. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, Tshimbalanga N, et al. Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173(1):122-9.
146. Kim CH, Kim DJ, Lee SJ, Jeong YJ, Kang MJ, Lee JY, et al. Tolllike receptor 2 promotes bacterial clearance during the initial stage of pulmonary infection with *Acinetobacter baumannii*. *Molecular medicine reports*. 2014;9(4):1410-4.
147. Lovewell RR, Patankar YR, Berwin B. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2014;306(7):L591-603.
148. Curran CS, Bolig T, Torabi-Parizi P. Mechanisms and Targeted Therapies for *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infection. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2018;197(6):708-27.
149. Michalska M, Wolf P. *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:963.
150. Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, et al. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *Journal of immunology*. 2005;174(6):3643-9.
151. Bianchi SM, Prince LR, McPhillips K, Allen L, Marriott HM, Taylor GW, et al. Impairment of apoptotic cell engulfment by pyocyanin, a toxic metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;177(1):35-43.
152. Rangel SM, Diaz MH, Knoten CA, Zhang A, Hauser AR. Correction: The Role of ExoS in Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during Pneumonia. *PLoS pathogens*. 2015;11(9):e1005163.
153. Gifford AM, Chalmers JD. The role of neutrophils in cystic fibrosis. *Current opinion in hematology*. 2014;21(1):16-22.
154. Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunological reviews*. 2016;273(1):11-28.

Referencias

155. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection*. 2003;5(14):1317-27.
156. Bardoel BW, Kenny EF, Sollberger G, Zychlinsky A. The balancing act of neutrophils. *Cell host & microbe*. 2014;15(5):526-36.
157. Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, et al. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2012;11(5):363-82.
158. Jensen PO, Givskov M, Bjarnsholt T, Moser C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2010;59(3):292-305.
159. Jesaitis AJ, Franklin MJ, Berglund D, Sasaki M, Lord CI, Bleazard JB, et al. Compromised host defense on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: characterization of neutrophil and biofilm interactions. *Journal of immunology*. 2003;171(8):4329-39.
160. Smith WD, Bardin E, Cameron L, Edmondson CL, Farrant KV, Martin I, et al. Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS microbiology letters*. 2017;364(14).
161. Evavold CL, Kagan JC. How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. *Journal of molecular biology*. 2018;430(2):217-37.
162. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(3):160-71.
163. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R. Control systems and decision making for antibody production. *Nature immunology*. 2010;11(8):681-8.
164. Chen W. Current advances and challenges in the development of *Acinetobacter* vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2015;11(10):2495-500.
165. Perez F, Bonomo RA. Vaccines for *Acinetobacter baumannii*: thinking "out of the box". *Vaccine*. 2014;32(22):2537-9.
166. McConnell MJ, Pachon J. Expression, purification, and refolding of biologically active *Acinetobacter baumannii* OmpA from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein expression and purification*. 2011;77(1):98-103.
167. Huang W, Yao Y, Wang S, Xia Y, Yang X, Long Q, et al. Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Scientific reports*. 2016;6:20724.

Referencias

168. Huang W, Wang S, Yao Y, Xia Y, Yang X, Long Q, et al. OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections. *Vaccine*. 2015;33(36):4479-85.
169. Garg N, Singh R, Shukla G, Capalash N, Sharma P. Immunoprotective potential of in silico predicted *Acinetobacter baumannii* outer membrane nuclease, NucAb. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2016;306(1):1-9.
170. Brossard KA, Campagnari AA. The *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein plays a role in adherence to human epithelial cells. *Infection and immunity*. 2012;80(1):228-33.
171. Lin L, Tan B, Pantapalangkoor P, Ho T, Hujer AM, Taracila MA, et al. *Acinetobacter baumannii* rOmpA vaccine dose alters immune polarization and immunodominant epitopes. *Vaccine*. 2013;31(2):313-8.
172. Fajardo Bonin R, Chapeaurouge A, Perales J, da Silva JG, Jr., do Nascimento HJ, D'Alincourt Carvalho Assef AP, et al. Identification of immunogenic proteins of the bacterium *Acinetobacter baumannii* using a proteomic approach. *Proteomics Clinical applications*. 2014;8(11-12):916-23.
173. Luo G, Spellberg B, Gebremariam T, Bolaris M, Lee H, Fu Y, et al. Diabetic murine models for *Acinetobacter baumannii* infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(6):1439-45.
174. Luo G, Lin L, Ibrahim AS, Baquir B, Pantapalangkoor P, Bonomo RA, et al. Active and passive immunization protects against lethal, extreme drug resistant-*Acinetobacter baumannii* infection. *PloS one*. 2012;7(1):e29446.
175. Thornton EE, Looney MR, Bose O, Sen D, Sheppard D, Locksley R, et al. Spatiotemporally separated antigen uptake by alveolar dendritic cells and airway presentation to T cells in the lung. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(6):1183-99.
176. Caucheteux SM, Torabi-Parizi P, Paul WE. Analysis of naive lung CD4 T cells provides evidence of functional lung to lymph node migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(5):1821-6.
177. Kambayashi T, Laufer TM. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nature reviews Immunology*. 2014;14(11):719-30.
178. Worbs T, Hammerschmidt SI, Forster R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2017;17(1):30-48.

Referencias

179. Hwang JY, Randall TD, Silva-Sanchez A. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. *Frontiers in immunology*. 2016;7:258.
180. Bayes HK, Bicknell S, MacGregor G, Evans TJ. T helper cell subsets specific for *Pseudomonas aeruginosa* in healthy individuals and patients with cystic fibrosis. *PloS one*. 2014;9(2):e90263.
181. Baluk P, Adams A, Phillips K, Feng J, Hong YK, Brown MB, et al. Preferential lymphatic growth in bronchus-associated lymphoid tissue in sustained lung inflammation. *The American journal of pathology*. 2014;184(5):1577-92.
182. Manni ML, Robinson KM, Alcorn JF. A tale of two cytokines: IL-17 and IL-22 in asthma and infection. *Expert review of respiratory medicine*. 2014;8(1):25-42.
183. Broquet A, Jacqueline C, Davieau M, Besbes A, Roquilly A, Martin J, et al. Interleukin-22 level is negatively correlated with neutrophil recruitment in the lungs in a *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia model. *Scientific reports*. 2017;7(1):11010.
184. Pan T, Tan R, Li M, Liu Z, Wang X, Tian L, et al. IL17-Producing gammadelta T Cells May Enhance Humoral Immunity during Pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mice. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2016;6:170.
185. Stanton BA. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on CFTR chloride secretion and the host immune response. *American journal of physiology Cell physiology*. 2017;312(4):C357-C66.
186. Moser C, Pedersen HT, Lerche CJ, Kolpen M, Line L, Thomsen K, et al. Biofilms and host response - helpful or harmful. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2017;125(4):320-38.
187. Mauch RM, Norregaard LL, Ciofu O, Levy CE, Hoiby N. IgG avidity to *Pseudomonas aeruginosa* over the course of chronic lung biofilm infection in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2018;17(3):356-9.
188. Merakou C, Schaeffers MM, Priebe GP. Progress Toward the Elusive *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine. *Surgical infections*. 2018;19(8):757-68.
189. Wan C, Zhang J, Zhao L, Cheng X, Gao C, Wang Y, et al. Rational Design of a Chimeric Derivative of PcrV as a Subunit Vaccine Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in immunology*. 2019;10:781.

Referencias

190. Schultz MJ, van der Poll T. Modulation of innate immune responses in the treatment of sepsis and pneumonia. *Current drug targets Inflammation and allergy*. 2004;3(1):11-7.
191. Gagliotti C, Buttazzi R, Di Mario S, Morsillo F, Moro ML. A regionwide intervention to promote appropriate antibiotic use in children reversed trends in erythromycin resistance to *Streptococcus pyogenes*. *Acta paediatrica*. 2015;104(9):e422-4.
192. van de Sande-Bruinsma N, Grundmann H, Verloo D, Tiemersma E, Monen J, Goossens H, et al. Antimicrobial drug use and resistance in Europe. *Emerging infectious diseases*. 2008;14(11):1722-30.
193. Heinsen FA, Knecht H, Neulinger SC, Schmitz RA, Knecht C, Kuhbacher T, et al. Dynamic changes of the luminal and mucosa-associated gut microbiota during and after antibiotic therapy with paromomycin. *Gut microbes*. 2015;6(4):243-54.
194. Schubert AM, Sinani H, Schloss PD. Antibiotic-Induced Alterations of the Murine Gut Microbiota and Subsequent Effects on Colonization Resistance against *Clostridium difficile*. *mBio*. 2015;6(4):e00974.
195. Stewardson AJ, Gaia N, Francois P, Malhotra-Kumar S, Delemont C, Martinez de Tejada B, et al. Collateral damage from oral ciprofloxacin versus nitrofurantoin in outpatients with urinary tract infections: a culture-free analysis of gut microbiota. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015;21(4):344 e1-11.
196. Netea MG, Quintin J, van der Meer JW. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell host & microbe*. 2011;9(5):355-61.
197. Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, et al. Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 2016;352(6284):aaf1098.
198. Cassone A. The Case for an Expanded Concept of Trained Immunity. *mBio*. 2018;9(3).
199. De Silva NS, Klein U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(3):137-48.
200. Kurosaki T, Kometani K, Ise W. Memory B cells. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(3):149-59.

Referencias

201. Rossmann FS, Kropec A, Laverde D, Saaverda FR, Wobser D, Huebner J. *In vitro* and *in vivo* activity of hyperimmune globulin preparations against multiresistant nosocomial pathogens. *Infection*. 2015;43(2):169-75.
202. Burton DR, Woof JM. Human antibody effector function. *Advances in immunology*. 1992;51:1-84.
203. Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annual review of immunology*. 2008;26:261-92.
204. Panda S, Ding JL. Natural antibodies bridge innate and adaptive immunity. *Journal of immunology*. 2015;194(1):13-20.
205. Schur PH. IgG subclasses--a review. *Annals of allergy*. 1987;58(2):89-96, 9.
206. Tarkoy M, Wyss M, Rudolf MP. A comparative characterization of dipentameric (IgM)₂ and pentameric IgM species present in preparations of a monoclonal IgM for therapeutic use. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2010;51(5):1084-90.
207. Woof JM, Kerr MA. The function of immunoglobulin A in immunity. *The Journal of pathology*. 2006;208(2):270-82.
208. Yan H, Lamm ME, Bjorling E, Huang YT. Multiple functions of immunoglobulin A in mucosal defense against viruses: an *in vitro* measles virus model. *Journal of virology*. 2002;76(21):10972-9.
209. Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengten E, et al. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nature immunology*. 2009;10(8):889-98.
210. Itoh H, Matsuo H, Kitamura N, Yamamoto S, Higuchi T, Takematsu H, et al. Enhancement of neutrophil autophagy by an IVIG preparation against multidrug-resistant bacteria as well as drug-sensitive strains. *Journal of leukocyte biology*. 2015;98(1):107-17.
211. Azik F, Bayram C, Erkocoglu M, Tezer H, Yazal Erdem A, Isik P, et al. Comparison of prophylactic use of intravenous immunoglobulin versus Pentaglobin(R) in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Pediatric transplantation*. 2016;20(2):276-83.
212. Alejandria MM, Lansang MA, Dans LF, Mantaring JB, 3rd. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis, severe sepsis and septic shock. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2013(9):CD001090.

Referencias

213. Capasso L, Borrelli AC, Parrella C, Lama S, Ferrara T, Coppola C, et al. Are IgM-enriched immunoglobulins an effective adjuvant in septic VLBW infants? Italian journal of pediatrics. 2013;39:63.
214. Wand S, Klages M, Kirbach C, Warszawska J, Meybohm P, Zacharowski K, et al. IgM-Enriched Immunoglobulin Attenuates Systemic Endotoxin Activity in Early Severe Sepsis: A Before-After Cohort Study. PloS one. 2016;11(8):e0160907.
215. Cui J, Wei X, Lv H, Li Y, Li P, Chen Z, et al. The clinical efficacy of intravenous IgM-enriched immunoglobulin (pentaglobin) in sepsis or septic shock: a meta-analysis with trial sequential analysis. Annals of intensive care. 2019;9(1):27.
216. Kukic BP, Savic NB, Stevanovic KS, Trailovic R, Cvetkovic SD, Davidovic LB. Effect of IgM-Enriched Immunoglobulin as Adjunctive Therapy in a Patient Following Sepsis After Open Thoracoabdominal Aortic Aneurysm Repair. Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia. 2016;30(3):746-8.
217. Lopez-Rojas R, McConnell MJ, Jimenez-Mejias ME, Dominguez-Herrera J, Fernandez-Cuenca F, Pachon J. Colistin resistance in a clinical *Acinetobacter baumannii* strain appearing after colistin treatment: effect on virulence and bacterial fitness. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013;57(9):4587-9.
218. Ayerbe-Algaba R, Gil-Marques ML, Miro-Canturri A, Parra-Millan R, Pachon-Ibanez ME, Jimenez-Mejias ME, et al. The anthelmintic oxyclozanide restores the activity of colistin against colistin-resistant Gram-negative bacilli. International journal of antimicrobial agents. 2019;54(4):507-12.
219. Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.). Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH publication. Bethesda, Md.: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service. p. v.
220. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019.
221. EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2019.
222. Cebrero-Cangueiro T, Alvarez-Marin R, Labrador-Herrera G, Smani Y, Cordero-Matia E, Pachon J, et al. In vitro Activity of Pentamidine Alone and in Combination With Aminoglycosides, Tigecycline, Rifampicin, and Doripenem Against Clinical Strains of Carbapenemase-Producing and/or Colistin-Resistant Enterobacteriaceae. Frontiers in cellular and infection microbiology. 2018;8:363.
223. Pachon-Ibanez ME, Labrador-Herrera G, Cebrero-Cangueiro T, Diaz C, Smani Y, Del Palacio JP, et al. Efficacy of Colistin and Its Combination With Rifampin in

Referencias

- Vitro and in Experimental Models of Infection Caused by Carbapenemase-Producing Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:912.
224. Del Toro R, Chevre R, Rodriguez C, Ordonez A, Martinez-Gonzalez J, Andres V, et al. Nestin(+) cells direct inflammatory cell migration in atherosclerosis. *Nature communications*. 2016;7:12706.
225. Harjula SE, Ojanen MJT, Taavitsainen S, Nykter M, Ramet M. Interleukin 10 mutant zebrafish have an enhanced interferon gamma response and improved survival against a *Mycobacterium marinum* infection. *Scientific reports*. 2018;8(1):10360.
226. Wells DJ. Animal welfare and the 3Rs in European biomedical research. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1245:14-6.
227. Aristoteli LP, Willcox MD. Mucin degradation mechanisms by distinct *Pseudomonas aeruginosa* isolates in vitro. *Infection and immunity*. 2003;71(10):5565-75.
228. Kim YJ, Jun YH, Kim YR, Park KG, Park YJ, Kang JY, et al. Risk factors for mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia; retrospective study of impact of combination antimicrobial therapy. *BMC infectious diseases*. 2014;14:161.
229. van Faassen H, KuoLee R, Harris G, Zhao X, Conlan JW, Chen W. Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. *Infection and immunity*. 2007;75(12):5597-608.
230. Breslow JM, Meissler JJ, Jr., Hartzell RR, Spence PB, Truant A, Gaughan J, et al. Innate immune responses to systemic *Acinetobacter baumannii* infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. *Infection and immunity*. 2011;79(8):3317-27.
231. Parker D, Ahn D, Cohen T, Prince A. Innate Immune Signaling Activated by MDR Bacteria in the Airway. *Physiological reviews*. 2016;96(1):19-53.
232. Cohen TS, Prince AS. Activation of inflammasome signaling mediates pathology of acute *P. aeruginosa* pneumonia. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(4):1630-7.
233. Yamada K, Morinaga Y, Yanagihara K, Kaku N, Harada Y, Uno N, et al. Azithromycin inhibits MUC5AC induction via multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in human airway epithelial cells. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2014;28(2):165-70.
234. Dennesen P, Veerman E, van Nieuw Amerongen A, Jacobs J, Kessels A, van der Keybus P, et al. High levels of sulfated mucins in bronchoalveolar lavage fluid of ICU

Referencias

- patients with ventilator-associated pneumonia. *Intensive care medicine*. 2003;29(5):715-9.
235. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature reviews Cancer*. 2009;9(12):874-85.
236. Rodriguez-Hernandez MJ, Pachon J, Pichardo C, Cuberos L, Ibanez-Martinez J, Garcia-Curiel A, et al. Imipenem, doxycycline and amikacin in monotherapy and in combination in *Acinetobacter baumannii* experimental pneumonia. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2000;45(4):493-501.
237. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature medicine*. 2008;14(3):282-9.
238. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature medicine*. 2008;14(3):275-81.
239. Pociask DA, Scheller EV, Mandalapu S, McHugh KJ, Enelow RI, Fattman CL, et al. IL-22 is essential for lung epithelial repair following influenza infection. *The American journal of pathology*. 2013;182(4):1286-96.
240. Martin JC, Beriou G, Heslan M, Chauvin C, Utraiainen L, Aumeunier A, et al. Interleukin-22 binding protein (IL-22BP) is constitutively expressed by a subset of conventional dendritic cells and is strongly induced by retinoic acid. *Mucosal immunology*. 2014;7(1):101-13.
241. Bayes HK, Ritchie ND, Ward C, Corris PA, Brodlie M, Evans TJ. IL-22 exacerbates weight loss in a murine model of chronic pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2016;15(6):759-68.
242. Fung C, Naughton S, Turnbull L, Tingpej P, Rose B, Arthur J, et al. Gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* in a mucin-containing synthetic growth medium mimicking cystic fibrosis lung sputum. *Journal of medical microbiology*. 2010;59(Pt 9):1089-100.
243. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal immunology*. 2008;1(3):183-97.
244. Wilk MM, Misiak A, McManus RM, Allen AC, Lynch MA, Mills KHG. Lung CD4 Tissue-Resident Memory T Cells Mediate Adaptive Immunity Induced by

Referencias

- Previous Infection of Mice with *Bordetella pertussis*. *Journal of immunology*. 2017;199(1):233-43.
245. Huang H, Li S, Zhang Y, Han X, Jia B, Liu H, et al. CD8(+) T Cell Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection. *Journal of virology*. 2017;91(22).
246. Contreras A, Beems MV, Tatar AJ, Sen S, Srinand P, Suresh M, et al. Co-transfer of tumor-specific effector and memory CD8+ T cells enhances the efficacy of adoptive melanoma immunotherapy in a mouse model. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2018;6(1):41.
247. Khan Y, Thalambedu N. Combined Immunotherapy in Metastatic Melanoma with Unknown Primary. *Cureus*. 2019;11(8):e5324.
248. Dunkley ML, Clancy RL, Cripps AW. A role for CD4+ T cells from orally immunized rats in enhanced clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung. *Immunology*. 1994;83(3):362-9.
249. Johnson RM, Brunham RC. Tissue-Resident T Cells as the Central Paradigm of Chlamydia Immunity. *Infection and immunity*. 2016;84(4):868-73.
250. Kengkla K, Kongpakwattana K, Saokaew S, Apisarnthanarak A, Chaiyakunapruk N. Comparative efficacy and safety of treatment options for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii* infections: a systematic review and network meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2018;73(1):22-32.
251. Koomanachai P, Kim A, Nicolau DP. Pharmacodynamic evaluation of tigecycline against *Acinetobacter baumannii* in a murine pneumonia model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(5):982-7.
252. Madadi-Goli N, Moniri R, Bagheri-Josheghani S, Dasteh-Goli N. Sensitivity of levofloxacin in combination with ampicillin-sulbactam and tigecycline against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Iranian journal of microbiology*. 2017;9(1):19-25.
253. Garnacho-Montero J, Amaya-Villar R, Ferrandiz-Millon C, Diaz-Martin A, Lopez-Sanchez JM, Gutierrez-Pizarra A. Optimum treatment strategies for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Expert review of anti-infective therapy*. 2015;13(6):769-77.
254. Hoyt TR, Dobrinen E, Kochetkova I, Meissner N. B cells modulate systemic responses to *Pneumocystis murina* lung infection and protect on-demand hematopoiesis

Referencias

- via T cell-independent innate mechanisms when type I interferon signaling is absent. *Infection and immunity*. 2015;83(2):743-58.
255. Klenovsek K, Weisel F, Schneider A, Appelt U, Jonjic S, Messerle M, et al. Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells. *Blood*. 2007;110(9):3472-9.
256. Babich T, Naucler P, Valik JK, Giske CG, Benito N, Cardona R, et al. Ceftazidime, carbapenems, or piperacillin-tazobactam as single definitive therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection - a multi-site retrospective study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2019.
257. Karaiskos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The "Old" and the "New" Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. *Frontiers in public health*. 2019;7:151.
258. Katoh H, Yasumoto H, Shimizu M, Hamaoka S, Kinoshita M, Akiyama K, et al. IV Immunoglobulin for Acute Lung Injury and Bacteremia in *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Critical care medicine*. 2016;44(1):e12-24.
259. Giamarellos-Bourboulis EJ, Tziolos N, Routsis C, Katsenos C, Tsangaris I, Pneumatikos I, et al. Improving outcomes of severe infections by multidrug-resistant pathogens with polyclonal IgM-enriched immunoglobulins. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;22(6):499-506.
260. Salihoglu O, Can E, Koc MO, Durmus E, Hatipoglu S. Pentaglobin as an adjunct therapy in very low birthweight neonates with nosocomial sepsis. *JPMMA The Journal of the Pakistan Medical Association*. 2013;63(11):1353-7.
261. Yavuz L, Aynali G, Aynali A, Alaca A, Kutuk S, Ceylan BG. The effects of adjuvant immunoglobulin M-enriched immunoglobulin therapy on mortality rate and renal function in sepsis-induced multiple organ dysfunction syndrome: retrospective analysis of intensive care unit patients. *The Journal of international medical research*. 2012;40(3):1166-74.
262. Yamagishi Y, Hagihara M, Kato H, Hirai J, Nishiyama N, Koizumi Y, et al. In vitro and in vivo Pharmacodynamics of Colistin and Aztreonam Alone and in Combination against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemotherapy*. 2017;62(2):105-10.

Referencias

263. Poulakou G, Lagou S, Karageorgopoulos DE, Dimopoulos G. New treatments of multidrug-resistant Gram-negative ventilator-associated pneumonia. *Annals of translational medicine*. 2018;6(21):423.
264. Tugrul S, Ozcan PE, Akinci O, Seyhun Y, Cagatay A, Cakar N, et al. The effects of IgM-enriched immunoglobulin preparations in patients with severe sepsis [ISRCTN28863830]. *Critical care*. 2002;6(4):357-62.
265. Barratt-Due A, Sokolov A, Gustavsen A, Hellerud BC, Egge K, Pischke SE, et al. Polyvalent immunoglobulin significantly attenuated the formation of IL-1beta in *Escherichia coli*-induced sepsis in pigs. *Immunobiology*. 2013;218(5):683-9.
266. Thomsen K, Christophersen L, Bjarnsholt T, Jensen PO, Moser C, Hoiby N. Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society*. 2016;15(2):171-8.
267. Shi H, Zhu J, Zou B, Shi L, Du L, Long Y, et al. Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017;95:1734-42.
268. Jahangiri A, Owlia P, Rasooli I, Salimian J, Derakhshanifar E, Naghipour Erami A, et al. Specific egg yolk antibodies (IgY) confer protection against *Acinetobacter baumannii* in a murine pneumonia model. *Journal of applied microbiology*. 2019;126(2):624-32.