

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



**Enfermedad neumocócica invasiva:
mecanismos moleculares de patogenicidad
y protección**

TESIS DOCTORAL

ELISA RAMOS SEVILLANO

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III

**Enfermedad neumocócica invasiva:
mecanismos moleculares de patogenicidad
y protección**

Tesis doctoral presentada por
Elisa Ramos Sevillano
para optar al Grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid

Directores:

Dr. Jose Yuste Lobo
Instituto de Salud Carlos III

Dr. Ernesto García López
Centro de Investigaciones
Biológicas, CSIC

MADRID, 2013

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la concesión de una beca dentro del Programa de Becas Predoctorales de Formación de personal universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación y al CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). No podría faltar mi agradecimiento a los dos centros de investigación que han hecho posible la realización de este trabajo, el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) y el Centro Nacional de Microbiología (ISCIII).

El primero de mis agradecimientos es para los Drs. Ernesto García, Pedro García, y Jose Yuste por abrirme su hogar y sentirme como si estuviera entre mi propia familia así como por darme la excelente oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio. Gracias por elegirme y darme esta oportunidad en el mundo de la ciencia y, en especial, por mostrarme el maravilloso mundo de neumococo. No sabéis lo contenta y orgullosa que estoy de formar parte de este laboratorio. Presumo mucho de ello y sé que me quedo corta en todo aquello que pueda decir sobre él.

Estoy tremendamente agradecida a mis dos directores, Jose Yuste y Ernesto García, por mostrarme qué es investigar. Vuestro apoyo y confianza en mi trabajo así como vuestro infinito aporte de ideas han sido fundamentales no sólo para el desarrollo de esta Tesis sino también para mi formación como investigadora. Una inmejorable orientación y el rigor experimental han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado entre los tres. Por supuesto, os agradezco el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta Tesis, ya que en los tiempos que corren me siento una privilegiada. Jose, gracias por tu apoyo incondicional recibido desde el día uno. Destacar muy positivamente tu fantástico sentido del humor; he de decir que el laboratorio 340 no volvió a ser el mismo desde que nos abandonaste y, lamentablemente, éste no es sólo un pensamiento personal. Tu gran capacidad para enseñar y transmitir, y tu motivación, hacen hoy que me sienta muy orgullosa de ti, no sólo como jefe, sino también como persona. No cabe duda de que tu participación en esta Tesis ha enriquecido el trabajo y, por supuesto, para mí ha significado el surgimiento de una gran amistad. Ernesto, resaltar tu disponibilidad y preocupación, que me han hecho avanzar muy positivamente en todo momento con esta Tesis. Te agradezco también tus rápidas y atentas respuestas a las distintas inquietudes surgidas durante este trabajo. Has aportado muchísimo tanto a mi persona como a mi formación. *iDe mayor quiero ser como tú!*

Rubén y Concha, vuestras múltiples visitas al laboratorio durante este tiempo siempre me han aportado algo. Gracias. A los Drs. Pedro García, Eduardo Díaz, Auxi Prieto, Teresa Zamarro, Manuel Carmona, Beatriz Galán y José Luis García, por todo lo que de vosotros he aprendido. No puedo olvidar a mis compañeros de laboratorio, Susana, Lidia, María Morales, Héctor, Mar y María Esteban, por supuesto, con los cuales he compartido incontables horas de trabajo. Gracias por los buenos y malos momentos, por aguantarme y por escucharme: ha sido un camino largo y duro en el que algunas veces la fijación por lograr tus objetivos te hace olvidar la importancia del contacto humano. A Eloí-

sa por toda la ayuda recibida. No puedo olvidarme de la Dra. Miriam Moscoso en este apartado, tu siempre atenta y efectiva colaboración han hecho posible gran parte de este trabajo. Toda conversación contigo ha sido más que enriquecedora tanto en lo científico como en lo personal. Estos 5 años en el laboratorio hacen que hoy me acuerde de manera especial de la Dra. Miriam Domenech. Siempre dispuesta a compartir sus conocimientos y experiencias de la manera más alegre posible. No puedo imaginar un laboratorio sin ti, quien además de guiarme con tu valiosa experiencia y tu sabio y oportuno consejo, me has ofrecido tu confianza, tu generosidad y tu entrañable amistad. A Rober, por su trato amable, comprensivo y en confianza que siempre me ha mostrado. Para el resto de compañeros, Ana V, Javier, Ife, Andrés, Juan, Cris, Julia, Nina, Iria, Lorein, Carmen, Fernando, Gonzalo y Susana Campuzano, las Yoguis Esther, Virginia, Zaira y Begoña, los *sounders* Carlitos y Julia, imil y mil gracias! Todo un placer el haber tenido la oportunidad de compartir el día a día con vosotros. A los chicos del 241, Carlos, Cristian y Rafa, por ocupar mi tiempo libre en tantas y tantas ocasiones.

Muchas gracias a todo el laboratorio de referencia de neumococos de Majadahonda, por acogerme tan alegremente en todas mis estancias por allí. Agradezco de manera especial al Prof. Lester Kobzik, de la Universidad de Harvard, por permitirme realizar la estancia breve en su laboratorio. Debo agradecer también su amabilidad y disponibilidad a la Dra. Zhiping Yang durante mi estancia en ese laboratorio. David, Freeman, Densesse, Glen y Samjukta, gracias por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación como investigadora. Gracias también a mi familia bostonia con *El Niño* a la cabeza.

A Carlos Castilla y a todo el personal del animalario de la Fundación Jiménez Díaz, gracias por haberme cedido tanto sus instalaciones como su ayuda durante la elaboración de esta Tesis, ya que sin ello este trabajo no hubiera salido adelante.

Me gustaría extender mi agradecimiento al Prof. Lorenzo Aguilar y a todo su equipo por compartir su experiencia y su amplio conocimiento en el campo de los antibióticos. También al Dr. José Antonio Bengoechea y a todo su laboratorio, por acogerme unas semanitas en la cálida Mallorca.

A toda mi familia, las dosis elevadas de cariño, comprensión y apoyo que hoy las veo recompensadas, espero que vosotros también. A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por quererme y apoyarme siempre. Fuente de ánimo casi inagotable cuando me sentí cansada. Habéis sido esenciales en los momentos difíciles. Todo este trabajo ha sido posible gracias a vosotros. A mi hermano Mamés y a mi hermana Julia, por ser los ejemplos claros de hermano mayor y por compartir vuestro buen humor y ayuda en todo momento; desde luego habéis ejercido plenamente vuestro rol de hermanos. Laura y Álvaro, daos por aludidos. A mi futuro sobrino, a ti también te quiero. Tampoco me olvido de Lucas, nuestro perro salchicha, todavía no he encontrado a nadie que se alegre tanto al verme como él, gracias por hacerme

evadir con tanta facilidad de las tensiones y el trabajo. A mis abuelos, que desde un sitio u otro siempre me han mirado con admiración, esto también se lo debo a ellos.

Quisiera dejar escrito mi agradecimiento a una persona muy especial que me ha mostrado mil veces con su propio ejemplo lo que significa ser una gran persona. Gracias, Raúl, por estar ahí en los momentos de decepciones y de desánimo que en algunas ocasiones he sufrido; siempre has mantenido el optimismo y has conseguido arrancarme una sonrisa. Gracias además por los continuos halagos y piropos que he recibido, por quererme completa, cuidarme y motivarme.

A mis amigos, Lucía, María, Choni, Esther, Lorena, Sara, Lara, AP, Fino, Chisco y Roger, aquellos a los que no he podido ver tanto como me hubiera gustado durante la elaboración de esta Tesis, por ocupar un lugar especial en mi vida. A mi prima Irene, por ser un gran apoyo, por haber sido siempre mi parte racional y mi gran amiga. Gracias por todo lo que hemos vivido juntas antes y durante este tiempo y por todo lo que nos depara el futuro. Gracias a mi "mejor amigo" Óscar, desde luego que la palabra amigo adquiere pleno significado contigo.

Finalmente y no por ello menos importante, a mis grandes amores Mónica, Bárbara, Cris y Elena. Gracias por tanto apoyo, ánimo, comprensión y paciencia. Me siento una afortunada por teneros siempre ahí, un *whatsapp* es suficiente para sacarme una sonrisa, Ya sabéis lo importantes que sois para mí y, aunque algunas estáis lejos, tengo la suerte de poder sentirme siempre acompañada. Las cinco hemos crecido y mucho en este tiempo. *¡Ha valido la pena!*

Espero que con estas líneas haya resumido toda la gratitud que siento hacia todas las personas que han estado presentes durante esa etapa, haciendo posible que hoy deje de ser un sueño para pasar a ser una realidad.

*A mis padres y
a mis hermanos*

*"Sólo una cosa vuelve un sueño imposible:
el miedo a fracasar"*
Paulo Coelho (1947)

ABREVIATURAS

Además de las unidades y abreviaturas aceptadas por el Sistema Internacional de Medidas (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>) y la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (<http://old.iupac.org/publications/epub/index.html#nt>), en esta tesis se han utilizado las siguientes abreviaturas:

AMP, ampicilina.
AMX, amoxicilina.
ANOVA, análisis de la varianza.
ATCC, *American Type Culture Collection* (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>).
AZM, azitromicina.
BALF, líquido obtenido por lavado broncoalveolar o *broncoalveolar lavage fluid*.
BSA, seroalbúmina bovina.
C+Y, medio CpH8 suplementado con extracto de levadura al 0.08%.
C+Y+A, medio C+Y suplementado con BSA al 0.08%.
C4BP, proteína de unión al factor C4b del complemento. Un regulador negativo de la vía clásica y de las lectinas.
CBD, dominio de unión a colina o *choline-binding domain*.
CBP, proteína de unión a colina o *choline-binding protein*.
CBR, secuencia repetida característica de las CBPs o *choline-binding repeat*.
CDC, citolisina(s) dependiente(s) de colesterol.
CDN, cefditoren.
CHL, cloranfenicol.
CLSM, microscopio (y microscopía) de barrido láser confocal.
CMI, concentración mínima inhibitoria.
CPS, polisacárido capsular.
CRO, ceftriaxona.
CRP, proteína C-reactiva.
CSP, péptido estimulador de la competencia o *competence-stimulating peptide*.
CTM, medio completo de transformación o *complete transformation medium*.
CTX, cefotaxima.
DEAE, dietilaminoetanol o dietilaminoetil.
DS, Desviación estándar.
DO, densidad óptica.
Doc, desoxicolato sódico.
EDTA, ácido etilendiaminotetraacético.
EGTA, ácido etilenglicoltetraacético.
ENI, enfermedad neumocócica invasiva o *invasive pneumococcal disease*.
ERY, eritromicina.
FAM-SE, 5,6-carboxifluoresceína, succidinimil éster.
fH, factor H; un regulador negativo de la vía alternativa del sistema del complemento.
fI, factor I; un regulador del sistema del complemento.
FITC, isotiocianato de fluoresceína.
GFP, proteína con fluorescencia verde o *green fluorescent protein*.
GWG, glicopolímero de la pared celular.
HBSS, tampón salino de Hank o *Hank's balanced salt solution*.
IC, índice de competitividad.

Ig, inmunoglobulina.
in, intranasal.
ip, intraperitoneal.
IPTG, isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
IRF, índice relativo de fluorescencia.
iv, intravenosa.
KAN, kanamicina.
LP, lipoproteína.
LTA, ácido lipoteicoico.
LVX, levofloxacino.
LytA, NAM-amidasa de neumococo.
MAC, complejo de ataque a la membrana o *membrane attack complex*.
MBL, lectina(s) de unión a manosa o *mannose-binding lectin*. También reciben el nombre conjunto de co-lectinas.
NCTC, *National Collection of Type Cultures* (<http://www.hpacultures.org.uk/collections/nctc.jsp>).
MDM, midecamicina.
NAM-amidasa, *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (EC 3.5.1.28).
NLR, receptor tipo NOD o *NOD-like receptor*.
NOD, dominio de unión a nucleótidos y de oligomerización o *nucleotide binding and oligomerization domain*.
PAF, factor de activación plaquetaria o *platelet-activating factor*.
PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida.
PAMP, patrón molecular asociado a patógenos o *pathogen-associated molecular pattern*.
PBP, proteína de unión a penicilina.
PBS, solución salina tamponada con fosfato (10 mM Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 6.8) o *phosphate-buffered saline*.
PCho, fosforilcolina.
PCV7, vacuna conjugada antineumocócica heptavalente.
PCV13, vacuna conjugada antineumocócica 13-valente.
PEN, penicilina.
PFA, paraformaldehído.
PIgR, receptor de las inmunoglobulinas poliméricas o *polymeric immunoglobulin receptor*.
Ply, neumolisina.
PMN, polimorfonuclear.
PRR, receptor de reconocimiento de patrones moleculares o *pattern-recognition receptors*.
PS, péptido señal.
^R, resistente.
rPAF, receptor del PAF.
SAP, componente amiloide del suero.
SC, componente secretor del receptor de las Ig poliméricas.
SDS, dodecilsulfato sódico.
SGM, estreptococo(s) del grupo mitis.
SH, suero hiperinmune.
SPT, espectinomycinina.
STR, estreptomycinina.
TA, ácido teicoico.
Tampón SP, tampón fosfato sódico 20 mM (ajustado a pH 6.9, salvo indicación en contra).
TE, tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM.

TET, tetraciclina.

THY, medio Todd-Hewitt con 0.5% de extracto de levadura.

TLR, receptor tipo Toll o *Toll-like receptor*.

Tris, tris (hidroximetil) amino metano.

TRITC, isocianato de tetrametil rodamina.

U, unidad(es) de actividad enzimática.

UFC, unidades formadoras de colonias.

ÍNDICE

SUMMARY	i-ix
I. INTRODUCCIÓN	1
1. GENERALIDADES DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	3
1.1. Aspectos históricos e importancia clínica	3
1.2. Características generales	4
1.3. Factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad neumocócica	5
1.4. Factores de virulencia de neumococo	6
1.4.1. Cápsula polisacáridica	7
1.4.2. Proteínas de superficie	8
1.4.2.1. CBPs	11
1.4.2.2. Proteínas LPXTG	16
1.4.2.3. Lipoproteínas	17
1.4.2.4. Proteínas "atípicas" de superficie	17
2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA	19
2.1. Adhesión y colonización nasofaríngea	20
2.2. Invasión	21
3. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR	23
3.1. Inmunidad humoral	23
3.1.1. El sistema del complemento	23
3.1.1.1. La vía clásica	25
3.1.1.2. La vía alternativa	26
3.1.1.3. La vía de las lectinas	26
3.1.1.4. Reguladores del sistema del complemento	27
3.1.1.5. Inactivación directa de componentes del complemento	28
3.2. Inmunidad celular	30
3.2.1. TLRs	30
3.2.2. NLRs e inflammasomas	33
3.2.3. Fagocitosis	34
3.2.3.1. Las selectinas	34
4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO	37
4.1. Prevención	37
4.1.1. Vacunas constituidas por polisacárido capsular	38
4.1.2. Vacunas conjugadas	39
4.1.3. Vacunas basadas en proteínas	40
4.2. Tratamiento antibiótico	41
4.2.1. Antibióticos β -lactámicos	41
4.2.2. Macrólidos	41
4.2.3. Quinolonas	42
4.3. Resistencia a los antibióticos	43
5. MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA	45

II. OBJETIVOS	47
III. MATERIALES Y MÉTODOS	51
1. CEPAS BACTERIANAS Y CRECIMIENTO	53
1.1. <i>Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos</i>	53
1.2. <i>Medios y condiciones de cultivo</i>	55
1.3. <i>Reactivos y productos</i>	55
1.4. <i>Estudios de susceptibilidad antibiótica</i>	56
1.5. <i>Obtención de suero humano, suero de ratón y suero hiperinmune</i>	56
2. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES ISOGÉNICOS	58
2.1. <i>Transformación genética</i>	58
3. TÉCNICAS DE DNA	59
3.1. <i>Preparación de DNA cromosómico</i>	59
3.2. <i>Preparaciones de DNA plasmídico</i>	59
3.3. <i>Electroforesis de DNA en geles de agarosa</i>	60
3.4. <i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	60
4. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS	61
4.1. <i>Expresión y purificación de enzimas líticas</i>	61
4.2. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS</i>	62
4.3. <i>Transferencia a membranas, incubación con anticuerpos y detección</i>	62
5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN CON EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	63
5.1. <i>Depósito del complemento: C3b, C1q, CRP, SAP, C4BP y fH</i>	63
5.2. <i>Efecto de los anticuerpos en la inmunidad frente a S. pneumoniae mediado por la presencia de antibióticos</i>	65
6. OPSONOFAGOCITOSIS DE S. PNEUMONIAE	66
6.1. <i>Marcaje de S. pneumoniae con FAM-SE</i>	66
6.2. <i>Fagocitosis mediada por macrófagos alveolares</i>	66
6.3. <i>Fagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares</i>	67
6.4. <i>Efecto de antibióticos β-lactámicos en la fagocitosis de S. pneumoniae mediada por neutrófilos</i>	68
6.5. <i>Microscopía láser confocal</i>	69
7. UNIÓN DE NEUMOCOCO A CÉLULAS NASOFARÍNGEAS	70
8. MODELOS ANIMALES	71
8.1. <i>Modelo de colonización en ratón</i>	71
8.2. <i>Modelos de sepsis y neumonía para determinar el grado de atenuación en virulencia de los diferentes mutantes en CBPs</i>	72
8.2.1. <i>Modelo de sepsis neumocócica</i>	72
8.2.2. <i>Modelo de neumonía neumocócica</i>	73
8.3. <i>Determinación de la dosis letal mínima</i>	74
8.4. <i>Protección por suero hiperinmune o antibióticos</i>	74
8.5. <i>Modelo de sepsis para determinar la protección mediada por antibióticos β-</i>	

<i>lactámicos en presencia de anticuerpos específicos</i>	74
8.6. Recuentos bacterianos en suero en los estudios de protección	75
8.7. Determinación de concentraciones de antibiótico en suero	75
9. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO	76
10. MICROSCOPIA ÓPTICA	77
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
IV. RESULTADOS	79
1. BASES MOLECULARES DE LA PATOGENESIS MEDIADA POR LAS PROTEÍNAS LYTB Y LYTC	81
1.1. Adhesión a células epiteliales de nasofaringe	81
1.2. Evasión del sistema del complemento	82
1.2.1. Evasión de la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares	83
1.2.2. Evasión de la fagocitosis mediada por neutrófilos PMNs	85
1.3. Papel de LytB y LytC en la enfermedad neumocócica	88
1.3.1. Colonización	88
1.3.2. Contribución de LytB y LytC a los procesos de neumonía y sepsis neumocócicas	88
2. PAPEL DE LA AUTOLISINA LYTA EN LA EVASIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR	92
2.1. Participación de LytA y Ply en la evasión del sistema del complemento	92
2.1.1. Análisis del depósito de C3b en la superficie bacteriana	92
2.1.2. Estudio de la activación de la vía clásica del complemento	96
2.1.3. Unión a reguladores negativos del complemento, C4BP y fH	98
2.2. Implicación de LytA y Ply en la evasión de la fagocitosis	100
2.2.1. Fagocitosis mediada por macrófagos alveolares	103
2.2.2. Fagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares	103
2.3. Contribución de LytA y Ply a la patogénesis de la enfermedad neumocócica	104
2.3.1. Modelo de sepsis	104
2.3.2. Modelo de neumonía	105
3. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR PSGL-1 EN LA INFECCIÓN NEUMOCÓCICA	107
3.1. Papel del receptor PSGL-1 en la fagocitosis mediada por PMNs	1107
3.1.1. La fagocitosis de neumococo a través del receptor PSGL-1 requiere la fosforilación de la tirosina quinasa SYK	108
3.2. Importancia de PSGL-1 en la neumonía y sepsis neumocócicas	111
3.2.1. Modelo de neumonía	112
3.2.2. Modelo de sepsis	113
3.2.3. Respuesta inflamatoria en ratones silvestres y mutantes PSGL-1 ^{-/-}	114
4. RESPUESTA DEL HOSPEDADOR FRENTE A LA INFECCIÓN POR S. PNEUMONIAE EN PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS	116
4.1. Papel de los antibióticos β-lactámicos CDN y CRO en la inmunidad mediada por el sistema del complemento	116
4.1.1. Reconocimiento de cepas resistentes de neumococo por proteínas de fase	

<i>aguda</i>	117
4.1.2. <i>Activación de la vía clásica del complemento</i>	119
4.1.3. <i>Depósito de C3b mediado por anticuerpos específicos en presencia de concentraciones subinhibitorias de CDN o CRO</i>	119
4.1.4. <i>Efecto de otros antibióticos sobre el depósito de C3b</i>	123
4.1.5. <i>CDN estimula la opsonofagocitosis de S. pneumoniae en presencia de anticuerpos específicos</i>	125
4.1.6. <i>Actividad de CDN en ratones preinmunizados</i>	126
V. DISCUSIÓN	133
1. BASES MOLECULARES DE LA PATOGÉNESIS MEDIADA POR LAS PROTEÍNAS LYTB Y LYTC DE NEUMOCOCO	135
2. PAPEL DE LA AUTOLISINA LYTA Y LA NEUMOLISINA PLY EN LA EVASIÓN DE LA DEFENSA INMUNE	140
3. NUEVAS PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS	145
VI. CONCLUSIONES	155
VII. BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXO	191

SUMMARY

INTRODUCTION: *Streptococcus pneumoniae*, the pneumococcus, is a major cause of bacterial sepsis and the most common etiologic agent of acute otitis media, community-acquired pneumonia as well as non-epidemic bacterial meningitis (Bogaert *et al.*, 2004; Wardlaw *et al.*, 2006). Pneumococcal disease is preceded by colonization, which is particularly common in children, with more than one serotype frequently colonizing the nasopharynx of the same individual at the same time (Bogaert *et al.*, 2004). Direct bacterial translocation from the nasopharynx to the bloodstream, generally known as occult bacteraemia, is a well-recognized complication of pneumococcal carriage, particularly in early childhood (Weiser, 2010). More than 25% of the 57 million annual deaths worldwide are estimated to be directly related to infectious diseases. Particularly, respiratory infections are responsible of the death of 4 million people every year. According to World Health Organization (WHO) estimates of sepsis or pneumonia in neonates and pneumonia in older children accounted for 29% of the 10.6 million yearly deaths in children younger than 5 years (10% and 19%, respectively), being *Streptococcus pneumoniae* the most common cause of severe pneumonia among children in developing countries (http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf) as well as in children and adults in Europe and the United States. Overall, the mortality rate of pneumococcal infections is higher than that originated by any other pathogenic bacteria. As a consequence, WHO and organizations such as the Wellcome Trust and the Bill & Melinda Gates Foundation consider the pneumococcal disease as a global burden. Disappointingly, there is much about the pathogenesis of *S. pneumoniae* meningitis and other invasive pneumococcal diseases which we still do not understand. This thesis prioritizes research on invasive pneumococcal disease at two levels: molecular basis of diseases and development of new therapies.

One of the main goals of the proposed research is to carry out a detailed study of some of the host-pathogen interactions that take place during the establishment and development of pneumococcal disease. For this purpose, the roles of different cell wall hydrolases (CWHs) in different phases of the pneumococcal disease (nasopharyngeal colonization, pneumonia and sepsis) have been studied using cell cultures and murine infection models. Several virulence factors of *S. pneumoniae* as

well as cellular receptors and host defence mechanisms of the immune response have been analysed in detail.

Although the capsular polysaccharide (CPS) of *S. pneumoniae* is a *sine qua non* requisite for virulence (López y García, 2004), there are increasing evidences showing that several pneumococcal surface proteins play important roles in pathogenesis although with largely unknown functions. Among them, one of the main goals of this Thesis was to investigate CWHs, *i.e.*, LytA, LytB, and LytC, that belong to the family of the so-called choline-binding proteins. These proteins are attached to the bacterial surface through non-covalent interactions with the phosphorylcholine residues present in teichoic and lipoteichoic acids. CWHs are surface proteins that cleave specific covalent bonds of the cell wall, and eventually, cause the lysis and death of the bacteria (López y García, 2004). Among these proteins, LytB is a CWH located closely to the polar ends of the cell. This enzyme has *N*-acetylglucosaminidase activity and plays an essential role in daughter cell separation (García *et al.*, 1999b; De las Rivas *et al.*, 2002). Moreover, it has been suggested that LytB, regardless of being polymorphic (Moscoso *et al.*, 2005), might be a promising target for the development of a universal pneumococcal vaccine because LytB antibodies significantly protected mice from a lethal challenge with different pneumococcal strains (Wize-mann *et al.*, 2001). Other well-characterized CWHs include the LytC lysozyme that, in contrast to LytB, has a general cell-surface distribution (Pérez-Dorado *et al.*, 2010). LytC has autolytic activity at 30°C and the fact that it has its maximum enzymatic activity at this temperature suggests that it might be more crucial in the upper respiratory tract (García *et al.*, 1999a). LytC is one of the major bacterial components that enable *S. pneumoniae* to lyse non-competent pneumococci (fratricide) (Eldholm *et al.*, 2009). Indeed, fratricide has been proposed as a mechanism of predation that contributes to virulence by regulating the release of several virulence factors. Although much work has been done under *in vitro* conditions, whether CWHs are important virulence factors involved in direct interaction with the host surfaces and/or in the establishment of pneumococcal disease has not been clearly defined. As a common colonizer of the upper respiratory tract, *S. pneumoniae* has developed an arsenal of components that are of great importance for biofilm formation and efficient colonization of the nasopharynx, which is the first step of pneumococcal virulence (Domenech *et al.*, 2012). Inactivation of LytB and LytC has been shown to hinder biofilm formation whereas simultaneous disruption of both CWHs markedly reduced biofilm establishment suggesting that both enzymes are important pneumo-

coccal components with additive (or synergistic) effects upon bacterial adhesion (Moscoso *et al.*, 2006; Domenech *et al.*, 2013).

Despite appropriate antibiotic treatment, invasive pneumococcal disease (IPD) is associated to high rates of morbidity and mortality worldwide. A major threat to fight IPD is the appearance of strains resistant to high levels of different antibiotic. Immunization is a safe and highly efficient approach to preventing IPD. Activation of complement cascades by specific antibodies, leads to the formation of the key component C3b that is crucial in host defence against pneumococcus by coating the microorganism and stimulating phagocytosis. In cases where the invading pathogen displays multidrug resistance, antimicrobial concentrations in serum may be insufficient and, therefore, the outcome of the infection will largely depend on the interaction between bacterial virulence factors and host immune mechanisms. One of the major aims of the current study was to investigate the activation of complement immunity and phagocytosis against three multiresistant, clinical pneumococcal isolates in the presence of specific antibodies and subinhibitory concentrations of different antibiotics.

PRINCIPAL FINDINGS: In this study, we have constructed isogenic mutants lacking LytB and/or LytC to analyse their role in the engagement and persistence of *S. pneumoniae* in the upper respiratory tract. We have also investigated the role of these proteins in evasion of complement immunity and phagocytosis. Moreover, we have explored the implication of LytB and LytC in the establishment of pneumococcal pneumonia and bacterial dissemination throughout the systemic circulation. Our results showed that LytB and LytC are involved in the attachment of *S. pneumoniae* to human nasopharyngeal cells both *in vitro* and *in vivo*. The interaction of both proteins with phagocytic cells demonstrated that LytB and LytC act in concert avoiding pneumococcal phagocytosis mediated by neutrophils or alveolar macrophages. Furthermore, C3b deposition was increased on the *lytC* mutant confirming that LytC is involved in complement evasion. As a result, the *lytC* mutant showed a reduced ability to successfully cause pneumococcal pneumonia and sepsis. Bacterial mutants lacking both LytB and LytC showed a dramatically impaired attachment to nasopharyngeal cells as well as a marked degree of attenuation in a mouse model of colonization. In addition, C3b deposition and phagocytosis were more efficient for the double *lytB lytC* mutant and its virulence was greatly impaired in both systemic and pulmonary models of infection. This study confirmed that the CWHs LytB and

LytC of *S. pneumoniae* are essential virulence factors involved in the colonization of the nasopharynx and in the progress of invasive disease.

Among other pneumococcal proteins that are involved in different steps of the pathogenesis process (Kadioglu *et al.*, 2008), pneumolysin (Ply) is a member of the cholesterol-dependent cytolysin family and plays a significant role in virulence by attacking cholesterol-containing membranes (Marriott *et al.*, 2008). In addition, Ply interacts with different components of the host immune response such as TLR4 and complement-mediated immunity modifying the inflammatory response and the recognition of *S. pneumoniae* by the first complement component of the classical pathway (C1q) (Yuste *et al.*, 2005). The release of Ply from the cytoplasm is mainly mediated by the main autolytic enzyme of the bacterium, LytA, which cleaves the *N*-acetylmuramyl-L-alanine bond of pneumococcal peptidoglycan. LytA participates in several physiologically important phenomena of *S. pneumoniae*, *e.g.*, cell separation, autolysis during the stationary phase of growth, lysis upon exposure to penicillin and other cell wall inhibitors, virulence, liberation of progeny bacteriophages, etc. (López y García, 2004). Several studies have shown that *lytA* mutants have attenuated virulence in animal models compared with isogenic wild type strains, but some results are controversial. LytA appears to affect pneumonia but not sepsis, although the mechanism is not well defined yet. The contribution of LytA to virulence is thought to be mediated by its function in the release of Ply and inflammatory mediators such as teichoic acids and peptidoglycan fragments from lysed bacterial cells (Canvin *et al.*, 1995).

There exist different virulence factors including the polysaccharide capsule and several proteins of *S. pneumoniae* that are involved in the evasion of complement-mediated immunity. This microorganism uses different strategies including impaired activation and increased inactivation by recruiting complement fluid-phase down-regulators to diminish the protective role of the complement system (Kadioglu *et al.*, 2008; van der Poll y Opal, 2009). Leukocytes play an important role in inflammatory and immune responses. Bacterial clearance depends on the efficacy of different receptors on the surface of phagocytic cells to recognize, internalize and kill the pathogen (Arredouani *et al.*, 2004; Lanoue *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2007). The initial phases of leukocyte migration to the site of infection after an inflammatory event caused by a microbial pathogen, involve leukocyte rolling that is mediated by interactions of selectins and selectin-ligand molecules (Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004). Expression of P- and E-selectins by the endothelium is involved in

the rolling process and also supports protection against invading pathogens such as *S. pneumoniae* (Munoz *et al.*, 1997). P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) mediates leukocyte interactions with P- and E-selectins expressed by the endothelium. It has been shown that PSGL-1 is a receptor for adhesion and entry in neutrophils used by several intracellular pathogens (Rikihisa, 2011) although its phagocytic role in *S. pneumoniae* infections is unknown.

The main aim of this part of the Thesis was to investigate the role of Ply and LytA in essential aspects of the pathogenesis process including host immune response evasion and pneumococcal dissemination. We show here that LytA avoids complement-mediated immunity by a complex mechanism of impaired activation, increased down-regulation and direct complement degradation. C3b deposition and phagocytosis of *S. pneumoniae* was greatly enhanced in the absence of LytA and pneumolysin demonstrating a synergistic effect by both proteins in host immune response evasion. Finally, a novel interaction with PSGL-1 was observed, with a significant involvement of LytA in this process. Bacterial levels were significantly increased in *PSGL-1*^{-/-} knockout mice confirming the importance of this receptor in the recognition and clearance of *S. pneumoniae*.

The successful outcome of infections caused by *S. pneumoniae* in humans depends on the humoral arm of the immune system (since opsonin/antibody dependent phagocytosis is the major defence mechanism against *S. pneumoniae*) as well as on an adequate antibiotic treatment. Natural defences and antibiotics may act concomitantly when using drugs as β -lactams acting on the cell wall that anchors the capsule. Since colonization is, to some extent, a B-cell immunizing event (Weinverger *et al.*, 2008) and preventive measures as pneumococcal vaccination are increasingly being used, antibodies to capsular polysaccharides (a surrogate marker of immunity) are likely to appear before infection. All these facts were explored in previous murine sepsis models (using a penicillin-resistant 6B *S. pneumoniae* isolate as infecting agent) where bacteraemia with high colony counts was related with mortality, and both (bacteraemia and mortality) decreased in a dose-related trend by administration of hyperimmune serum or β -lactams (Yuste *et al.*, 2002a, b). When combined therapies (hyperimmune serum plus β -lactam) were explored, the strategy based on passive immunization (prior to infection) followed by post-infection administration of β -lactam was more effective than non-immune serum plus post-infection administered antibiotic therapies (Yuste *et al.*, 2002b). β -Lactams have little effect on the chemotaxis of neutrophils towards areas of infection. However, some of them

can increase the oxidative burst of neutrophils by scavenging oxidative species or by inhibition of myeloperoxidase (Labro, 2000). Enhancing this oxidative burst response by β -lactams may render some bacterial species more susceptible to phagocytic killing, although the mechanism is not fully understood. In this sense, we have previously reported that the combined effect of amoxicillin or cefotaxime with specific antibodies increases the rate of bacterial clearance in a mouse model (Yuste *et al.*, 2001). In addition, the presence of anti-pneumococcal antibodies led to therapeutic efficacy with subinhibitory concentrations of β -lactam antibiotics (Casal *et al.*, 2002). Moreover, phagocytosis mediated by human or mouse neutrophils was increased when antibiotic-resistant pneumococcal strains were incubated with serum containing specific antibodies and sub-MIC concentrations of β -lactams (Cafini *et al.*, 2010). Whether the synergism between anti-pneumococcal antibodies and β -lactams is due to a direct interaction of the antimicrobial drug with the host immune system is unclear. To determine whether this effect is partially due to increased recognition of *S. pneumoniae* by the complement system and whether it might be extended to other groups of antibiotics was another goal of this Thesis.

We used three pneumococcal isolates (strains 1515, 69 and 48) of different serotypes and levels of susceptibility/resistance. Hyperimmune serum (HS) was obtained from mice immunized with heat-inactivated strains. Phagocytosis by HS in the presence (or in the absence) of subinhibitory concentrations of antibiotics was measured. To determine the minimal protective and the non-protective (np) highest dilutions/doses over 7 days, *in vivo* dose-ranging experiments with HS and cefditoren (CDN) were performed. Efficacy of CDN-np in animals pre-immunized with HS-np (combined strategy) was explored and blood bacterial clearance determined. The CDN measured protein binding was 86.9%. CDN significantly increased phagocytosis *in vitro*. In non pre-immunized animals, %T_{MIC} values for CDN of <35% (total) and <19% (free) were associated with 100% survival. Significant differences in survival were found between HS-np alone (<20%) or CDN-np alone (<20%) vs. the combined strategy (90%, 60% and 60% for strains 1515, 69, and 48), with %T_{MIC} (total/free) of 22.8%/14.3%, 26.8%/16.0%, and 22.4%/12.7% for strains 1515, 69, and 48, respectively. Prior to the second dose (8 h), median bacterial counts were significantly lower in animals surviving vs. dead, at day 7.

A flow cytometry assay was used to determine whether complement-mediated immunity against three antibiotic-resistant *S. pneumoniae* clinical isolates is enhanced in the presence of subinhibitory concentrations of CDN and ceftriaxone

(CRO). The binding of acute phase proteins, such as C-reactive protein and serum amyloid P component, and of complement component C1q to pneumococci was enhanced in the presence of serum plus either of the two antibiotics. Both antibiotics therefore trigger the activation of the classical complement pathway against *S. pneumoniae*. C3b deposition was also increased in the presence of specific anti-pneumococcal antibodies and subinhibitory concentrations of CDN and CRO confirming that the presence of these antibiotics enhances complement-mediated immunity to *S. pneumoniae*. To investigate whether LytA, the main cell wall hydrolase of *S. pneumoniae*, might be involved in this process, *lytA* mutants were constructed. In the presence of antibiotics, loss of LytA was not associated with enhanced C3b deposition on the pneumococcal surface, which confirms the importance of LytA in this interaction.

Using CDN and CRO to promote the binding of acute phase proteins and C1q to pneumococci, and to increase C3b deposition when anti-pneumococcal antibodies are present, might help reduce the impact of antibiotic resistance in *S. pneumoniae* infections. The results of this study offer new insights into the development of novel therapeutic strategies using some antibiotics by increasing the efficacy of the host immune response to efficiently recognize pneumococcal resistant strains. These findings reinforce the concept that immunoprotection to overcome resistance may provide lifesaving strategies.

CONCLUSIONS: This study confirms that the LytB and LytC, two CWHs of *S. pneumoniae*, are essential virulence factors involved in the colonization of the nasopharynx and in the progress of invasive disease by avoiding host immunity. In the same way, our results demonstrate that LytA and Ply are very important virulence factors of *S. pneumoniae* that divert complement-mediated immunity allowing the bacterium an efficient dissemination to the systemic circulation, and both proteins impair the recognition and phagocytosis of *S. pneumoniae* by professional phagocytes. In addition, the findings of the current Thesis demonstrate a novel role for PSGL-1 in host defence against pneumococcus.

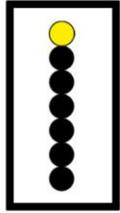
The impact of antibiotic resistance in *S. pneumoniae* infections might be reduced using cefditoren and ceftriaxone to promote the binding of acute phase proteins and C1q to pneumococci, and to increase C3b deposition, when anti-pneumococcal antibodies are present. Therefore, immunoprophylaxis approaches to diminish the im-

pact of antibiotic resistance may be a novel and promising strategy to increase the outcome of pneumococcal infection.

REFERENCES

- Arredouani, M., Yang, Z., Ning, Y., Qin, G., Soininen, R., Tryggvason, K. y Kobzik, L. (2004) The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J. Exp. Med.* **200**: 267–272.
- Bogaert, D., de Groot, R. y Hermans, P.W.M. (2004) *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* **4**: 144–154.
- Cafini, F., Yuste, J., Giménez, M.-J., Sevillano, D., Aguilar, L., Alou, L., *et al.* (2010) Enhanced in vivo activity of cefditoren in pre-immunized mice against penicillin-resistant *S. pneumoniae* (serotypes 6B, 19F and 23F) in a sepsis model. *PLoS One* **5**: e12041.
- Canvin, J.R., Marvin, A.P., Sivakumaran, M., Paton, J.C., Boulnois, G.J., Andrew, P.W. y Mitchell, T.J. (1995) The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J. Infect. Dis.* **172**: 119–123.
- Casal, J., Aguilar, L., Jado, I., Yuste, J., Giménez, M.J., Prieto, J. y Fenoll, A. (2002) Effects of specific antibodies against *Streptococcus pneumoniae* on pharmacodynamic parameters of β -lactams in a mouse sepsis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1340–1344.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R. y García, P. (2002) Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- β -N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* **184**: 4988–5000.
- Domenech, M., García, E. y Moscoso, M. (2012) Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Biotechnol.* **5**: 455–465.
- Domenech, M., García, E., Prieto, A. y Moscoso, M. (2013) Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ. Microbiol.* **15**: 502–516.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H.S. y Håvarstein, L.S. (2009) Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology* **155**: 2223–2234.
- García, P., González, M.P., García, E., García, J.L. y López, R. (1999a) The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* **33**: 128–138.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R. y García, J.L. (1999b) LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* **31**: 1275–1277.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C. y Andrew, P.W. (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 288–301.
- Ku, C.-L., von Bernuth, H., Picard, C., Zhang, S.-Y., Chang, H.-H., Yang, K., *et al.* (2007) Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4 deficient children: IRAK-4 dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *J. Exp. Med.* **204**: 2407–2422.
- Labro, M.-T. (2000) Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 615–650.
- Lanoue, A., Clatworthy, M.R., Smith, P., Green, S., Townsend, M.J., Jolin, H.E., *et al.* (2004) SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice. *J. Exp. Med.* **200**: 1383–1393.
- López, R. y García, E. (2004) Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 553–580.

- Marriott, H.M., Mitchell, T.J. y Dockrell, D.H. (2008) Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr. Mol. Med.* **8**: 497–509.
- Moscoso, M., Obregón, V., López, R., García, J.L. y García, E. (2005) Allelic variation of the polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8706–8713.
- Moscoso, M., García, E. y López, R. (2006) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.* **188**: 7785–7795.
- Munoz, F.M., Hawkins, E.P., Bullard, D.C., Beaudet, A.L. y Kaplan, S.L. (1997) Host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae* is impaired in E-, P-, and E-/P-selectin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **100**: 2099–2106.
- Pérez-Dorado, I., González, A., Morales, M., Sanles, R., Striker, W., Vollmer, W., et al. (2010) Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 576–581.
- Rikihisa, Y. (2011) Mechanisms of obligatory intracellular infection with *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 469–489.
- van der Poll, T. y Opal, S.M. (2009) Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**: 1543–1556.
- Vicente-Manzanares, M. y Sánchez-Madrid, F. (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 110–122.
- Wardlaw, T., Salama, P., Johansson, E.W. y Mason, E. (2006) Pneumonia: the leading killer of children. *Lancet* **368**: 1048–1050.
- Weinberger, D.M., Dagan, R., Givon-Lavi, N., Regev-Yochay, G., Malley, R. y Lipsitch, M. (2008) Epidemiologic evidence for serotype-specific acquired immunity to pneumococcal carriage. *J. Infect. Dis.* **197**: 1511–1518.
- Weiser, J.N. (2010) The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J. Mol. Med.* **88**: 97–102.
- Wizemann, T.M., Heinrichs, J.H., Adamou, J.E., Erwin, A.L., Kunsch, C., Choi, G.H., et al. (2001) Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect. Immun.* **69**: 1593–1598.
- Yuste, J., Giménez, M.J., Jado, I., Fenoll, A., Aguilar, L. y Casal, J. (2001) Enhanced decrease of blood colony counts by specific anti-pneumococcal antibodies in the presence of sub-inhibitory concentrations of amoxicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**: 594–595.
- Yuste, J., Jado, I., Fenoll, A., Aguilar, L., Giménez, M.J. y Casal, J. (2002a) β -Lactam modification of the bacteraemic profile and its relationship with mortality in a pneumococcal mouse sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**: 331–335.
- Yuste, J., Jado, I., Giménez, M.J., Aguilar, L., Molero, F., Fenoll, A. y Casal, J. (2002b) Modification of bacteraemia by specific antibodies and relation with mortality in a pneumococcal mouse sepsis model. *Clin. Exp. Immunol.* **128**: 411–415.
- Yuste, J., Botto, M., Paton, J.C., Holden, D.W. y Brown, J.S. (2005) Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J. Immunol.* **175**: 1813–1819.



I. INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

1.1. Aspectos históricos e importancia clínica

En 1881, Louis Pasteur y George M. Sternberg describieron, de forma independiente y casi simultánea, el aislamiento de un microorganismo, presente en la saliva humana, capaz de causar enfermedad sistémica en conejos (Pasteur, 1881; Sternberg, 1981). Este microorganismo resultó ser una bacteria Gram-positiva, catalasa-negativa que ha recibido, desde entonces, una gran variedad de denominaciones (White *et al.*, 1979). Debido a la capacidad que tiene este patógeno de formar cadenas y a su asociación con neumonías, pasó a denominarse *Streptococcus pneumoniae* en 1980, nombre por el cual es conocido en la actualidad (Skerman *et al.*, 1980).

S. pneumoniae es un microorganismo patógeno casi exclusivamente humano (Denapaite y Hakenbeck, 2011), capaz de causar diversas infecciones y procesos invasivos severos y que fue calificado, en 1901 por Sir William Osler —médico canadiense considerado como el padre de la medicina moderna— como “el capitán de los hombres de la muerte” (Osler, 1910). Desde su identificación, *S. pneumoniae* (comúnmente referido como neumococo), continúa siendo responsable de un gran espectro de enfermedades infecciosas, desde patologías relativamente leves, como la otitis media y la conjuntivitis, a neumonías invasivas, septicemia y meningitis. Se calcula que la tercera parte de las muertes anuales que se producen en el mundo son debidas a enfermedades infecciosas y, entre todas ellas, las enfermedades respiratorias son las responsables del fallecimiento de 4 millones de personas cada año (Morens *et al.*, 2004). De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, la sepsis, la neumonía neonatal y la neumonía comunitaria en niños mayores dan cuenta de casi el 30% de los 10.6 millones de muertes anuales en niños menores de 5 años, siendo *S. pneumoniae* el causante más frecuente de neumonía infantil severa, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (UNICEF y WHO, 2006). En países desarrollados, la morbilidad y mortalidad relacionadas con neumococo han cambiado muy poco desde el primer aislamiento del patógeno con, al menos, un millón de muertes al año en la población infantil, atribuidas principalmente a la neumonía neumocócica (UNICEF y WHO, 2006). Además, también cada año, se producen casi 15 millones de casos graves

de enfermedad neumocócica en la población infantil (O'Brien *et al.*, 2009). Por otra parte, algunos cálculos indican que los costes, directos e indirectos, producidos como consecuencia de las infecciones neumocócicas en personas de edad avanzada en EE.UU. pueden superar los 5000 millones de dólares anuales (Weycker *et al.*, 2010).

Neumococo ha protagonizado una brillante historia en el campo de la biología (Austrian, 1981a; Watson *et al.*, 1993; Portugal, 2010; Kushner y Samols, 2011). Ya en 1891, Kemplerer y Kemplerer (citado por Austrian, 1981b) observaron que el suero procedente de conejos que habían sido previamente inoculados con neumococos inactivados por calor, era capaz de proteger frente a una reinfección con la misma cepa infectante pero no necesariamente frente a otros aislados clínicos. Es más, cuando los animales no sensibilizados recibían una dosis de suero procedente de conejos inmunizados, la protección frente a la infección con la misma cepa se incrementaba, introduciéndose así el concepto de inmunidad humoral. En los años veinte del pasado siglo, se demostró que el polisacárido capsular (CPS) era el responsable de la actividad inmunológica de neumococo y, además, que confería una protección cepa-específica en ratones, convirtiéndose en el primer antígeno no proteico identificado (Heidelberger y Avery, 1923, 1924; Heidelberger *et al.*, 1925). Por otra parte, en 1928, Griffith demostraba que una infección mixta de ratones utilizando neumococos capsulados (pero muertos por calentamiento) y neumococos no capsulados (y, por tanto, avirulentos) y vivos, resultaba en la muerte de algunos animales. El estudio de las bacterias recuperadas de los animales muertos revelaba que la bacteria no capsulada había adquirido un CPS serológicamente idéntico al de la cepa que había sido inactivada por calor (Griffith, 1928). La sustancia de naturaleza desconocida responsable de este cambio recibió el nombre de "principio transformante". Sin embargo, la contribución más importante de neumococo a la biología molecular (Reichard, 2002; López, 2006) fue el descubrimiento de que la molécula responsable de la transformación, esto es, de la herencia genética, era el DNA (Avery *et al.*, 1944; McCarty y Avery, 1946) y no las proteínas, como se creía por entonces.

1.2. Características generales

Neumococo, es una bacteria Gram-positiva de 0.5–1.0 μm de longitud, que presenta una forma cocoide con extremos lanceolados. El hábitat natural de neumococo

es la nasofaringe humana y la colonización puede tener lugar poco después del nacimiento. Generalmente, se presenta en forma de diplococo por lo que, hasta los años setenta, fue denominado *Diplococcus pneumoniae*. Es inmóvil, no forma endosporas y es un miembro α -hemolítico del género *Streptococcus*. Cuando se cultiva en placas de agar-sangre en aerobiosis presenta una marcada α -hemólisis —formación de metahemoglobina (Butterfield y Peabody, 1913; Cole, 1914b) — debido a la producción de peróxido de hidrógeno (Barnard y Stinson, 1996) pero, si es incubado en anaerobiosis, se observa β -hemólisis debida a la acción de la neumolisina (Ply) (Johnson *et al.*, 1982).

Neumococo es un microorganismo microaerófilo (prolifera en tensiones bajas de oxígeno), catalasa negativo y sensible a las sales biliares como el desoxicolato sódico (Doc) (Neufeld, 1900); este detergente dispara la acción incontrolada de la principal autolisina (LytA; *N*-acetilmuramoi-L-alanina amidasa o NAM-amidasa) que degrada la pared celular en un proceso absolutamente dependiente de colina (Mossler y Tomasz, 1970; Høltje y Tomasz, 1975; García *et al.*, 1985). Este patrón de susceptibilidad a Doc se utiliza en la identificación del microorganismo.

Otra de las pruebas diagnósticas universalmente utilizada para la identificación de neumococo en el laboratorio clínico, es la sensibilidad a optoquina (Lund y Henriksen, 1978), un derivado de la quinina que actúa como inhibidor específico de determinadas proteínas que forman parte de la subunidad F_0 de la ATPasa protón-motriz (H^+ -ATPasa) de neumococo (Fenoll *et al.*, 1994; Balsalobre *et al.*, 2006).

1.3. Factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad neumocócica

S. pneumoniae es una de las principales causas de enfermedad invasiva en todo el mundo afectando tanto a individuos sanos (sin enfermedad de base conocida) como a pacientes inmunodeprimidos. La incidencia de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) varía geográficamente y es especialmente alta en ciertos grupos de edad, entre los que se encuentran los niños menores de 2 años y la población mayor de 65 años (Parsons y Dockrell, 2002). El sistema inmune de la población pediátrica, al no estar completamente desarrollado, tiene una menor capacidad para responder a los antígenos polisacáridicos, lo que se manifiesta en una mayor vulnerabilidad a determinadas infecciones bacterianas. Además, la colonización y adquisición de nuevas cepas de neumococo es más frecuente en la población infantil, lo

cual podría contribuir a la alta incidencia de la enfermedad en este segmento de la población (Hussain *et al.*, 2005).

Existen diversos factores que predisponen a padecer la enfermedad neumocócica (Mufson *et al.*, 2012) como son las inmunodeficiencias congénitas (Lingappa *et al.*, 2011), las infecciones respiratorias previas o concomitantes (principalmente las de origen vírico) (McCullers, 2006; Short *et al.*, 2012), padecer el virus de inmunodeficiencia humana (Siemieniuk *et al.*, 2011), la leucemia y los linfomas (Wong *et al.*, 2010). Además, aquellas personas que sufren de anemia falciforme son particularmente vulnerables, ya que son incapaces de eliminar la bacteria capsulada de su sangre (McCavit *et al.*, 2011). Los pacientes que toman algún tipo de medicación inmunosupresora como, por ejemplo, aquellos que han sufrido un trasplante, tienen también un elevado riesgo de ENI (del Pozo, 2008). Lo mismo ocurre en los pacientes con bronquitis crónica o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (dos Santos *et al.*, 2012). También el alcoholismo y el tabaquismo se asocian con una gran probabilidad de desarrollar ENI (Nuorti *et al.*, 2000; Bhatti *et al.*, 2011). Este efecto puede ser el resultado de una disminución del movimiento ciliar así como del daño producido en las células epiteliales lo que favorece la colonización y adherencia de la bacteria y disminuye los mecanismos de defensa del hospedador. Deficiencias en diferentes componentes del complemento también se han asociado con la aparición de episodios recurrentes de ENI (Ram *et al.*, 2010). Además, deficiencias genéticas en componentes relacionados con el reconocimiento de patógenos, como los receptores tipo Toll (TLRs), la quinasa asociada al receptor de interleuquina 1 (IRAK4), MyD88 y NEMO se han asociado también a episodios recurrentes de ENI, lo que demuestra la importancia de los sistemas de detección y vigilancia del hospedador en la lucha frente a neumococo (Picard *et al.*, 2011).

1.4. Factores de virulencia de neumococo

Las bacterias, al igual que otros organismos patógenos, sintetizan moléculas que les proporcionan una ventaja selectiva, frecuentemente a expensas del hospedador. Dichas moléculas, o factores de virulencia, permiten al microorganismo colonizar e invadir al hospedador facilitando su adhesión a los tejidos, su capacidad de invasión, la evasión del sistema inmune del hospedador, o varios de estos mecanismos simultáneamente. La mayoría de estos factores de virulencia son, además del CPS

en neumococo y otras bacterias, proteínas de superficie (Nobbs *et al.*, 2009; Moschioni *et al.*, 2010; Gámez y Hammerschmidt, 2012; Pérez-Dorado *et al.*, 2012).

1.4.1. La cápsula polisacáridica

La cápsula de neumococo (o polisacárido capsular; CPS) es el principal factor de virulencia del microorganismo. No parece poseer un papel determinante en la adhesión, invasión o inflamación en el hospedador pero confiere al microorganismo una importante capacidad de evasión fagocítica (Hyams *et al.*, 2010). La cápsula, aunque prescindible para la viabilidad de la bacteria en condiciones de laboratorio, es, sin embargo y como ya se mencionó previamente, un requisito fundamental para su patogenicidad (Griffith, 1928). No obstante, se han encontrado cepas de neumococo no tipificables (previsiblemente carentes de CPS) que causan frecuentes brotes de conjuntivitis (Porat *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007), así como casos aislados de conjuntivitis (Haas *et al.*, 2011) u otitis media (Xu *et al.*, 2011).

La cápsula de neumococo está formada por polisacáridos complejos que, a su vez, están compuestos por unidades repetitivas de azúcares (Kamerling, 2000) unidas al peptidoglicano o a componentes de la membrana, aunque, en algunos casos, pueden liberarse de la célula (Yother, 2011; Eberhard *et al.*, 2012). En la actualidad, se han descrito 94 serotipos capsulares inmunológicamente diferentes, 90 de los cuales fueron descritos hasta 1995 (Henrichsen, 1995) y cuatro más han sido identificados en los últimos años —posiblemente como consecuencia del desarrollo de métodos analíticos más sensibles—, concretamente los serotipos 6C (Park *et al.*, 2007a, b), 6D (Bratcher *et al.*, 2009, 2010), 11E (Zartler *et al.*, 2009; Calix y Nahm, 2010) y la separación en dos serotipos (A y B) de aislados del antiguo serotipo 20 (Calix *et al.*, 2012). Los 94 serotipos capsulares actuales se agrupan en 46 serogrupos numerados del 1 al 48 (los números 26 y 30 no se utilizan). Algunos serogrupos como el 1, 2 y 3, incluyen un único serotipo mientras que otros, como el serogrupo 11, pueden contener hasta 6. Normalmente, el primer serotipo descrito en un serogrupo con varios serotipos se identifica con la letra F (por *first*) y los siguientes con las letras A, B, etc. Existen, no obstante, tres excepciones: el serogrupo 6, que incluye los serotipos 6A, 6B, 6C y 6D, el 20, con los serotipos 20A y 20B, y el serogrupo 9, en el que las letras de los tres primeros serotipos descritos (Vammen, 1939) tienen relación con personajes históricos (L por Lederle, N por Neufeld y V

por Valdemar, un príncipe danés muerto en 1938 de una neumonía bacteriémica y del que se aisló el primer neumococo de este serotipo) (Henrichsen, 1995).

Como ya se ha mencionado anteriormente, los anticuerpos anticapsulares fueron inicialmente descritos como protectores en modelos animales, convirtiendo a la cápsula en una candidata prometedora para el desarrollo de vacunas. Sin embargo, la elevada diversidad capsular junto con las variaciones que existen en la capacidad inmunogénica de los diferentes polisacáridos, han complicado el desarrollo de vacunas basadas exclusivamente en el CPS (ver más abajo). Dentro de una cepa y serotipo particular, la presencia de una menor producción de CPS se corresponde con una disminución en la virulencia (MacLeod y Krauss, 1950), lo que concuerda con la observación previa de que una ausencia completa del CPS está asociada a una pérdida total de invasividad (Griffith, 1928). Los genes involucrados en la producción de la cápsula están localizados en un mismo locus y típicamente codifican una *flipasa*, una polimerasa y varias transferasas que catalizan la formación de enlaces, adición de azúcares y modificación de unidades repetidas. Los primeros cuatro genes del locus referidos como *capA–D* o *cpsA–D*, están altamente conservados en todos los serotipos —excepto en los serotipos 3 y 37— y han sido implicados, entre otras funciones, en la regulación de la biosíntesis del CPS (Llull *et al.*, 2001; López y García, 2004; Moscoso y García, 2009; Yother, 2011).

La cantidad de CPS sintetizado por neumococo varía con las condiciones ambientales (Ogunniyi *et al.*, 2002), lo que, probablemente, afecta al grado de exposición de las proteínas de superficie, repercutiendo de este modo en la patogénesis de neumococo (Kim y Weiser, 1998). En el torrente sanguíneo, por ejemplo, muchos factores de virulencia asociados con la pared celular (ver más abajo) están enmascarados, parcial o totalmente, por el CPS. Este enmascaramiento se considera como una de las posibles causas por las que se produce la evasión de la fagocitosis y, en consecuencia, una reducción en la eliminación del neumococo de la sangre. Por el contrario, niveles bajos de CPS podrían incrementar la exposición de ciertas proteínas de superficie.

1.4.2. Proteínas de superficie

Además del CPS, *S. pneumoniae* sintetiza una gran variedad de proteínas de superficie que participan en numerosos procesos de interacción con el hospedador y que son esenciales para la patogénesis de la bacteria durante la colonización y los

estados de dispersión e invasión, por lo que muchas de ellas son también consideradas factores de virulencia (Fig. 1). Debido al importante papel de las proteínas de superficie en la interrelación con el hospedador, a la capacidad inmunogénica de muchas de ellas y a su frecuente presencia en la mayoría de los aislados clínicos de diferentes serotipos, estas proteínas constituyen buenas candidatas como antígenos potencialmente útiles para el diseño de vacunas (para revisiones recientes, véase Kadiouglu *et al.*, 2008; Preston y Dockrell, 2008; Mitchell y Mitchell, 2010; Gámez y Hammerschmidt, 2012) (Tabla 1). Los estudios de análisis masivo de genes están identificando nuevos posibles factores de virulencia cuya función es desconocida en el momento actual. La caracterización de *pili* y bacteriocinas, así como la de genes asociados con competencia, metabolismo y resistencia a estrés oxidativo ha permitido dar un paso más en el conocimiento de la diversidad genética de *S. pneumoniae*.

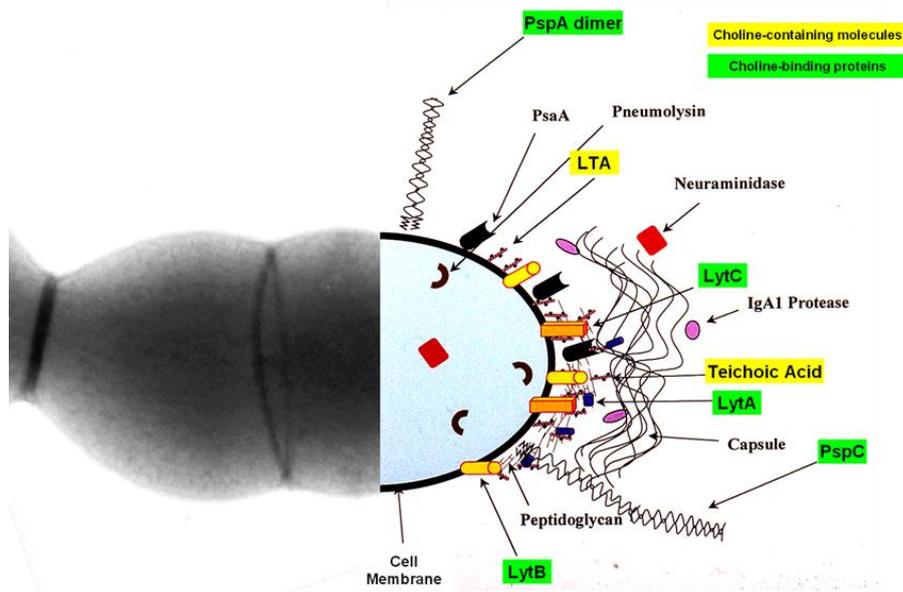


Fig. 1. Representación esquemática de algunas proteínas y otras moléculas de superficie implicadas en la virulencia de *S. pneumoniae*. Modificada de Briles *et al.* (1998).

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Principales proteínas de *S. pneumoniae* implicadas en patogénesis

Proteína ^a	Función	Referencia
CBPs		
LytA	NAM-amidasa (EC 3.5.1.28). Principal autolisina.	Ronda <i>et al.</i> , 1987; Gosink <i>et al.</i> , 2000
LytB	<i>N</i> -acetilglucosaminidasa. Separación de las células al final de la división celular.	García <i>et al.</i> , 1999a
LytC	Lisozima (EC 3.2.1.17). Autolisina a 30°C.	García <i>et al.</i> , 1999b; Gosink <i>et al.</i> , 2000
Pce	Fosforilcolín esterasa. Hidrolasa de pared celular. Se une a plasminógeno.	Gosink <i>et al.</i> , 2000; Attali <i>et al.</i> , 2008a, b
PspA	Proteína A de superficie de neumococo. Se une a lactoferrina humana.	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1999
PspC	Proteína C de superficie de neumococo. Se une al factor H del sistema del complemento.	Dave <i>et al.</i> , 2001
CbpG	Posible serín proteasa	Gosink <i>et al.</i> , 2000
LPXTG		
NanA	Neuraminidasa	Uchiyama <i>et al.</i> , 2009; Banerjee <i>et al.</i> , 2010
IgA	Zinc metaloproteasa de IgA1	Weiser <i>et al.</i> , 2003
Lipoproteínas		
PsaA	Lipoproteína transportadora de manganeso. Se une a cadherina E.	Johnston <i>et al.</i> 2004; Anderton <i>et al.</i> 2007
PiuA/PiA	Componentes lipoproteicos de transportadores ABC	Jomaa <i>et al.</i> , 2005, 2006
Otras		
HtrA	Serín-proteasa	Sebert <i>et al.</i> , 2002
PavA	Proteína A de adhesión y virulencia. Se une a fibronectina.	Holmes <i>et al.</i> , 2001; Pracht <i>et al.</i> , 2005; Kadioglu <i>et al.</i> , 2010
PepO	Endopeptidasa. Se une a plasminógeno y fibronectina	Agarwal <i>et al.</i> , 2013
Eno	Fosfopiruvato hidratasa (α -enolasa) (EC 4.2.1.11). Se une a plasminógeno	Attali <i>et al.</i> , 2008a
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.12). Se une a plasminógeno	Attali <i>et al.</i> , 2008a
Ply	Citolisina dependiente de colesterol. Forma poros en las membranas celulares.	Marriot <i>et al.</i> , 2008

^a Pce, se denomina también LytD y CbpE; PspC se denomina también CbpA, SpsA y PbcA. LPXTG, proteínas que se unen covalentemente al peptidoglicano mediante la acción de una sortasa.

En las bacterias Gram-positivas se han descrito, al menos, seis sistemas diferentes de translocación de proteínas a través de la membrana citoplásmica: 1) el sistema Sec, que es probablemente el más importante y depende de la existencia en la proteína de un péptido señal (PS) localizado normalmente en posición N-terminal (Chatzi *et al.*, 2013); 2) el denominado “transportador de parejas de argininas” (*twi-arginine transporter*; Tat) que permite la translocación de proteínas previamente plegadas y que reconoce un motivo característico de dos residuos de arginina en el PS (Palmer y Berks, 2012); 3) el exportador FPE, implicado en la translocación de proteínas que forman estructuras de tipo pilina (Chen y Dubnau, 2004); 4) el aparato de exportación de los flagelos (FEA) (Büttner, 2012); 5) el sistema de proteínas tipo holina codificado por fagos (Catalão *et al.*, 2012), y 6) el sistema de secreción denominado WXG100 que, en algunas bacterias patógenas, permite la translocación de ciertos factores de virulencia que contienen un motivo EX hacia la parte central del polipéptido (Sutcliffe, 2011; Schneewind y Missiakas, 2012). Por otra parte, algunas de las proteínas traslocadas permanecen unidas a la envuelta celular, tanto unidas a la membrana (lipoproteínas; LPs) como a la pared celular—proteínas con motivos LPXTG reconocidos por la sortasa A— u otras estructuras superficiales (Spirig *et al.*, 2011; Schneewind y Missiakas, 2012), mientras que otras

se transportan al medio extracelular para lo que, previamente, deben atravesar la gruesa capa de peptidoglicano (Forster y Marquis, 2012).

Hasta el momento, se han descrito cuatro familias de proteínas neumocócicas de superficie (Pérez-Dorado *et al.*, 2012): además de las LPs y las proteínas con motivos LPXTG, también presentes en otras bacterias Gram-positivas, se encuentra la familia de las proteínas de unión a colina (CBPs) y las proteínas de superficie “atípicas” que, aparentemente, carecen simultáneamente de PS y de motivos de anclaje a las estructuras superficiales, que son también conocidas como proteínas “pluriempleadas” o *moonlighting* (Henderson y Martin, 2011).

1.4.2.1. CBPs

Las CBPs (López y García, 2004) se encuentran ancladas de un modo específico a los residuos de colina de los ácidos teicoicos (TAs) y lipoteicoicos (LTAs) de la superficie celular (Fischer *et al.*, 1993; Seo *et al.*, 2008; Reichmann y Gründling, 2011). La mayoría de estos glicopolímeros asociados a la pared celular de la bacteria constituyen patrones moleculares de reconocimiento de patógenos que activan el receptor humano TLR2 (Fig. 2) (Zähringer *et al.*, 2008). De ahí que se considere que los LTAs de *S. pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* u otras muchas bacterias, tienen actividad inmunoestimuladora. Una de las características más notables de neumococo es que tanto sus TAs como los LTAs se encuentran unidos covalentemente a moléculas de fosforilcolina (PCho); este aminoalcohol se une a través de un enlace fosfodiéster a los residuos de *N*-acetilgalactosamina de TAs y LTAs y promueve la adhesión de la bacteria a las células del hospedador mediante el reconocimiento del receptor del factor de activación plaquetario (rPAF) localizado en la superficie de las mismas (Cundell *et al.*, 1995).

Proteínas de la familia de las CBPs pueden encontrarse también en otras especies bacterianas que contienen residuos de colina en su pared, como ocurre en otras especies de estreptococos del grupo mitis (SGM) y, en particular, en *Streptococcus pseudopneumoniae* (Llull *et al.*, 2006; Shahinas *et al.*, 2011), *Streptococcus mitis* (Moscoso *et al.*, 2005b; Campuzano *et al.*, 2009; Hakenbeck *et al.*, 2009; Denapaité *et al.*, 2010; Madhour *et al.*, 2011) y *Streptococcus oralis* (Ronda *et al.*, 1988, 1991; Horne y Tomasz, 1993; Reichmann *et al.*, 2011), así como en otras

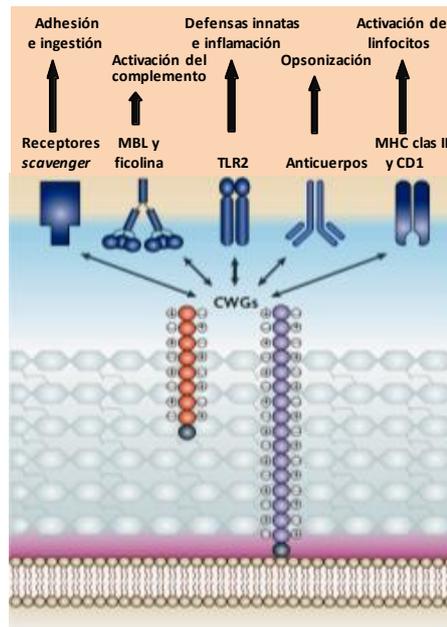


Fig. 2. Interacción de glicopolímeros de la pared celular (GWGs) con moléculas del hospedador. Los receptores de tipo *scavenger*, las lectinas de unión a manosa (MBL) y las ficolinas, interaccionan con diversos GWGs de la bacteria permitiendo así la unión a e internalización en las células del hospedador, la activación del complemento o ambos. Varios GWGs parecen generar una respuesta inflamatoria por parte del hospedador aunque la relevancia de este descubrimiento ha sido cuestionada recientemente. La respuesta inmune adaptativa frente a bacterias Gram-positivas incluye la unión de anticuerpos a GWGs y, además, éstos pueden ser reconocidos por linfocitos T específicos. Modificado de Weidenmaier y Peschel, 2008.

bacterias más alejadas filogenéticamente de neumococo como *Clostridium beijerinckii* (García *et al.*, 2000), *Clostridium difficile* (Demarest *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2005) y *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Shimoji, 2000; To y Nagai, 2007; Ogawa *et al.*, 2011). El número de CBPs de *S. pneumoniae* depende de la cepa bacteriana pero parece variar entre, aproximadamente, 10 y 15 (Frolet *et al.*, 2010; Madhour *et al.*, 2011). Con la posible excepción de CbpF (Molina *et al.*, 2009), las CBPs constan de, al menos, dos dominios diferentes, uno de unión a colina (CBD) —que le permite unirse de modo no covalente a los residuos de colina de la superficie de la bacteria— y uno o más dominios funcionales responsable(s) de la actividad biológica de

la proteína, ya sea ésta enzimática o no (López y García, 2004) (Fig. 3). Cada CBD está formado por un número variable de repeticiones (CBRs) de unos 20 aminoácidos cada uno, muchos de ellos aromáticos (García *et al.*, 1988). En la mayoría de las CBPs, el CBR se encuentra en el dominio C-terminal. Gracias a la cristalización de este dominio en diferentes CBPs, como LytA (Fernández-Tornero *et al.*, 2001, 2002), Pce (Hermoso *et al.*, 2005), CbpF (Molina *et al.*, 2009), Spr1274 (Zhang *et al.*, 2009) o LytC (Pérez-Dorado *et al.*, 2010), se sabe que el CBD se pliega formando una estructura en forma de horquilla β que da lugar a una superhélice levógira con forma característica de solenoide. Con la notable excepción de LytA, CbpG y CbpI, las demás CBPs de neumococo poseen un PS que determina su localización en la superficie celular (Fig. 3).

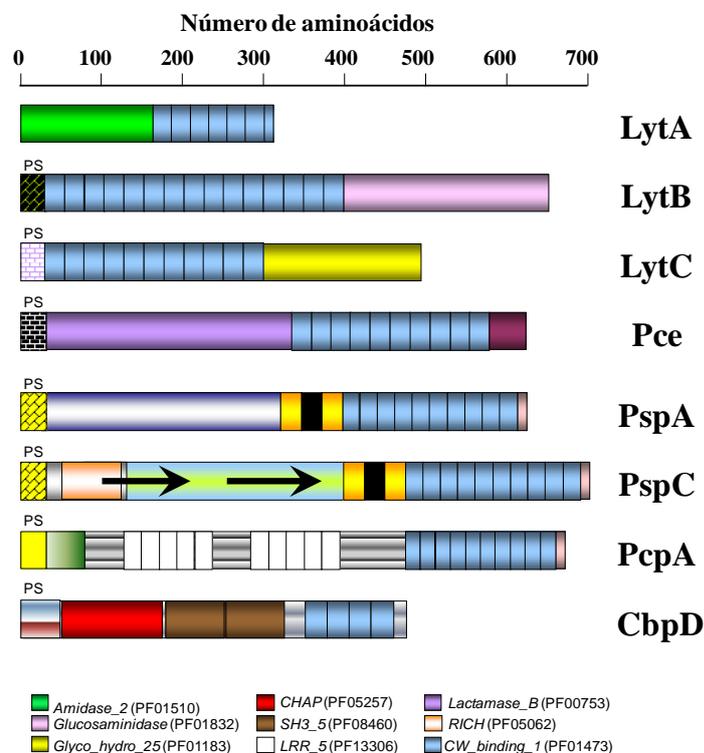


Fig. 3. Representación esquemática de la organización modular de algunas CBPs de *S. pneumoniae*. Los diferentes módulos han sido denominados como se indica en la base de datos Pfam (versión 25.0) (Finn *et al.*, 2010). Las regiones homólogas se indican con idénticos colores y sombreados. PS, péptido señal.

Algunas CBPs pueden causar eventualmente la lisis y consiguiente muerte de la bacteria, en cuyo caso son llamadas autolisinas. La NAM-Amidasa LytA (Sánchez-Puelles *et al.*, 1986; Ronda *et al.*, 1987) y la lisozima LytC (García *et al.*, 1999b) son las únicas dos autolisinas conocidas de neumococo. LytA está considerada como uno de los factores de virulencia más importantes de la bacteria debido fundamentalmente a su capacidad para producir autólisis espontánea (tanto en la fase estacionaria como la producida por determinados antibióticos) y la concomitante liberación de la neumolisina Ply al medio extracelular (Berry y Paton, 2000; López y García, 2004). El papel de esta proteína en patogénesis ha sido demostrado previamente utilizando mutantes *lytA* que presentan una disminución significativa en la virulencia en diferentes modelos animales de infección (Berry y Paton, 2000; Hirst *et al.*, 2008). Además, la inmunización con LytA ha demostrado poseer un efector protector frente a una posterior infección neumocócica (Berry *et al.*, 1989; Yuan *et al.*, 2011). LytA es también parcialmente responsable de la intensa respuesta inflamatoria característica de la infección neumocócica al liberar componentes altamente proinflamatorios como fragmentos de la pared celular, TAs y LTAs, tras la lisis bacteriana (Sato *et al.*, 1996; Majcherczyk *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2003; Moreillon y Majcherczyk, 2003; Koedel, 2009; Davis y Weiser, 2011). Asimismo, se considera que LytA participa indirectamente en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador mediada por el sistema del complemento y la fagocitosis al liberar Ply (Paton *et al.*, 1984; Martner *et al.*, 2009). En contrapartida, la administración parenteral de LytA es capaz de reducir los niveles bacterianos en un modelo de sepsis (Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007). Además, esta autolisina es capaz de desintegrar con gran eficacia los biofilmes producidos por *S. pneumoniae in vitro* (Domenech *et al.*, 2011).

La lisozima LytC (Fig. 3) se comporta como una autolisina a 30°C y el hecho de que presente su máxima actividad enzimática a esta temperatura sugiere que podría ser crucial en el tracto respiratorio superior (García *et al.*, 1999b). Además, LytC desempeña un papel esencial en el denominado “fratricidio”, una característica que permite a *S. pneumoniae* lisar a neumococos no competentes (Claverys y Håvarstein, 2007; Pérez-Dorado *et al.*, 2010; Wei y Håvarstein, 2012). Este proceso ha sido propuesto como un mecanismo de predación que contribuye a la virulencia mediante la regulación de la liberación de distintos factores de virulencia. Además, LytC es capaz de unirse al DNA en un proceso independiente del tamaño, configu-

ración o contenido en G+C, contribuyendo de manera decisiva a la formación de biofilmes de neumococo (Domenech *et al.*, 2013).

LytB es una CBP con actividad *N*-acetilglucosaminidasa que está implicada en la separación de las células hijas al final del proceso de división (García *et al.*, 1999a; De las Rivas *et al.*, 2002) y, posiblemente, en la adhesión de neumococo a las células de la nasofaringe humana (Gosink *et al.*, 2000). Además, es importante para la formación de biofilmes (Moscoso *et al.*, 2006; Domenech *et al.*, 2013). Recientemente, se ha observado la producción de anticuerpos anti-LytB en niños aquejados de otitis media aguda (Pichichero *et al.*, 2012).

PspC (Briles *et al.*, 1997), también conocida como CbpA (Rosenow *et al.*, 1997), SpsA (Hammerschmidt *et al.*, 1997) y PbcA (Cheng *et al.*, 2000), es la CBP más abundante en neumococo y participa en patogénesis mediante diferentes mecanismos. PspC está implicada en la adherencia a las células del hospedador y en la colonización bacteriana (Rosenow *et al.*, 1997). Es importante hacer notar que PspC exhibe un notable polimorfismo (Brooks-Walter *et al.*, 1999; Iannelli *et al.*, 2002) entre diferentes aislados de neumococo. Las proteínas pertenecientes al subgrupo 1 son CBPs típicas (Fig. 3), mientras que las del subgrupo 2 representan un grupo atípico ya que no son CBPs sino que se unen covalentemente a la pared celular en un proceso sortasa A-dependiente al poseer un motivo tipo LPXTG. Estas formas atípicas de PspC —denominadas Hic por *factor H-binding inhibitor of complement*— están codificadas por un gen situado en la misma posición que los genes *pspC* típicos (Janulczyk *et al.*, 2000). Aunque con algunas diferencias, ambos tipos de proteínas (PspC y Hic) parecen poseer propiedades similares. Como adhesina, PspC actúa uniéndose al dominio extracelular tipo inmunoglobulina (Ig) (también llamado ectodominio, componente secretor o SC) del receptor de las Ig poliméricas (PIgR) mediante motivos hexapeptídicos (Y/R) RNYPT localizados en las repeticiones directas R1 y R2 de PspC (indicadas como flechas negras en la Fig. 3) (Hammerschmidt *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2005). También se han identificado posibles epítomos de unión al factor H (fH) —un regulador negativo de la vía alternativa del complemento— en la región N-terminal de PspC (Lu *et al.*, 2006; Hammerschmidt *et al.*, 2007), aunque parece claro que fH y SC se unen a diferentes regiones de PspC. Cuando fH se une a la superficie de neumococo vía PspC se incrementa la adhesión del microorganismo a las células del hospedador. Es interesante destacar que, además de fH, PspC es asimismo capaz de reclutar otro regulador negativo del complemento, en este caso de la ruta clásica, denominado la proteína de unión al

factor C4b del complemento o C4BP, lo que permitiría a neumococo evadir eficazmente la activación del componente C3b (Jarva *et al.*, 2003; Dieudonné-Vatran *et al.*, 2009).

Otras CBPs de neumococo con papel en virulencia incluyen: 1) PspA (McDaniel *et al.*, 1987), que participa en patogénesis al facilitar la evasión de la activación de la vía alternativa del complemento y previniendo los efectos bactericidas de la lactoferrina humana (Jedrzejewski, 2006). 2) La fosforilcolín esterasa Pce (Höltje y Tomasz, 1974; Vollmer y Tomasz, 2001; de las Rivas *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2005), también denominada CbpE. Esta CBP libera residuos de PCho de los TAs de la pared celular y participa en la adhesión a las células de la nasofaringe humana (Gosink *et al.*, 2000). 3) PcpA fue originalmente propuesta como una adhesina (Sánchez-Beato *et al.*, 1998), su expresión se encuentra controlada por las concentraciones de Mn^{2+} y Zn^{2+} (Johnston *et al.*, 2006; Kloosterman *et al.*, 2008; Ogunniyi *et al.*, 2010) y se ha demostrado que, usándola como vacuna, protege significativamente utilizando modelos murinos de neumonía y sepsis (Glover *et al.*, 2008). Recientemente, se ha descrito que PcpA participa en la adherencia de neumococo a células epiteliales de nasofaringe y pulmón (Khan *et al.*, 2012) y que, además, es capaz de inducir la formación de anticuerpos funcionales en seres humanos (Posfay-Barbe *et al.*, 2011; Hagerman *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2012; Selva *et al.*, 2012) constituyendo un componente prometedor para el desarrollo de nuevas vacunas (Bologa *et al.*, 2012).

La mureín-hidrolasa CbpD, específica del estado de competencia (Eldholm *et al.*, 2010), es otro miembro de la familia de las CBPs que podría participar en la adhesión de *S. pneumoniae* a las células del hospedador y ser relevante durante el proceso de infección (Gosink *et al.*, 2000).

1.4.2.2. Proteínas LPXTG

Como ya se apuntó anteriormente, este grupo de proteínas se encuentra en muchas bacterias Gram-positivas y contienen un motivo LPXTG que es la base para su unión covalente a la pared celular. Las proteínas pertenecientes a este grupo son translocadas a la pared celular, a través de una transpeptidación llevada a cabo por una enzima denominada sortasa. Hasta 18 proteínas de este tipo han sido descritas en neumococo, la mayoría de las cuales poseen alguna actividad enzimática (como glicosil-hidrolasas o proteasas), actúan como adhesinas, o ambas (Pérez-Dorado *et*

al., 2012). Dentro de este grupo de proteínas se encuentra, por ejemplo, la neuraminidasa predominante de neumococo, NanA, que juega un papel importante en la persistencia de la bacteria en el oído medio y, por tanto, en el desarrollo de la otitis media aguda (Tong *et al.*, 2000). No obstante, su implicación en infección sistémica parece ser menos importante (Berry y Paton, 2000) aunque, más recientemente, se ha observado que NanA es capaz de inducir una notable repuesta leucocitaria con producción de citoquinas pro-inflamatorias (Chang *et al.*, 2012).

1.4.2.3. Lipoproteínas

Las LPs bacterianas se anclan a la membrana celular mediante modificaciones en su dominio N-terminal (*N*-acil-S-diacilgliceril-Cys) (Babu *et al.*, 2006). La mayoría de las LPs parecen tener un papel relevante en el *fitness* bacteriano (Bergmann y Hammerschmidt, 2006). Dentro de las aproximadamente 50 LPs que se han identificado en algunas estirpes de *S. pneumoniae*, unas 25 son transportadores ABC (*ATP-binding cassette transporters*). Además, hay otras LPs que participan en el proceso de plegamiento de proteínas o activación de moléculas de superficie, como la sortasa StrC-3 que está involucrada en la formación del pilus (Manzano *et al.*, 2008). En relación al resto de LPs, sigue aún sin caracterizarse cuál puede ser su función fisiológica en neumococo (Babu *et al.*, 2006). En cualquier caso, recientemente, se ha puesto en evidencia que mutantes de delección en el gen *lgt* que codifica la pro-LP diacilgliceril transferasa —responsable de la unión de las pro-LPs a la membrana bacteriana— muestran un crecimiento limitado tanto en sangre como en el lavado broncoalveolar (BALF) y una virulencia reducida en modelos murinos de infección (Chimalapati *et al.*, 2012).

1.4.2.4. Proteínas “atípicas” de superficie

Éstas son, en principio, proteínas intracelulares de la bacteria y, por tanto, no deberían establecer interacciones directas patógeno-hospedador, como ocurre con las proteínas de superficie mencionadas anteriormente. No obstante, estudios recientes han puesto en evidencia que estas proteínas carecen de motivos conocidos de unión a la superficie bacteriana y, en su mayoría, también de PS, son accesibles desde el exterior del microorganismo y establecen relaciones de adhesión con las células del hospedador (Nobbs *et al.*, 2009). De las cinco proteínas de este tipo de-

tectadas hasta la fecha en neumococo, sólo la serín-proteasa HtrA (Sebert *et al.*, 2002) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa 6PGD (Daniely *et al.*, 2006) parecen poseer PS (datos no mostrados), mientras que PavA (*pneumococcal adherence and virulence protein A*) (Holmes *et al.*, 2001), Eno (enolasa) (Bergmann *et al.*, 2001) y GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) (Bergmann *et al.*, 2004) carecen tanto de PS como de motivos de unión a la superficie. Este último caso podría también ser aplicable a PGK, una fosfoglicerato quinasa de *S. pneumoniae* (Bernardo-García *et al.*, 2011), que se ha visto que se une a actina y plasminógeno en *Streptococcus agalactiae* (Boone y Tyrrell, 2012). Los mecanismos por los cuales estas proteínas “atípicas” alcanzan la superficie celular y permanecen asociadas a ellas son desconocidos actualmente.

Una proteína que podría pertenecer a las denominadas proteínas “atípicas” de superficie es la neumolisina (Ply), en el sentido de que carece de PS y de motivos conocidos de unión a la superficie bacteriana. Ply pertenece al grupo de proteínas denominadas citolisinas dependientes de colesterol (CDC) (Hotze y Tweten, 2012), constituye uno de los factores de virulencia clásicos de neumococo y su existencia fue detectada ya en los primeros años del pasado siglo (Libman, 1905; Cole, 1914a). Ply es un miembro de la familia de toxinas citolíticas (Dunstone y Tweten, 2012) y está presente en todos los aislados clínicos de este patógeno (Marriot *et al.*, 2008) aunque, recientemente, se ha informado de la existencia de mutantes naturales de *S. pneumoniae* que producen una Ply no hemolítica y son, sin embargo, muy invasivos (Ritchie *et al.*, 2012). Ply tiene múltiples actividades independientes en patogénesis, por ejemplo, activa el complemento (por la vía clásica) reduciendo la disponibilidad de componentes del complemento para el reconocimiento de neumococo (Paton *et al.*, 1984). Esta proteína es capaz también de estimular la apoptosis de las células del hospedador (Braun *et al.*, 2002) y actúa como citolisina mediante la unión al colesterol presente en la membrana de las células eucarióticas, insertándose en las membranas celulares y formando poros de 350–450 Å de diámetro (Tilley *et al.*, 2005). La presencia de Ply ha sido definida como esencial en el establecimiento de la ENI en diferentes modelos de neumonía neumocócica invasiva (Rubins *et al.*, 1995; Kadioglu *et al.*, 2002; Maus *et al.*, 2004; Witzentrath *et al.*, 2006), sepsis (Yuste *et al.*, 2005) y meningitis (Wellmer *et al.*, 2002; Hirst *et al.*, 2008; Hupp *et al.*, 2012), así como en infecciones oculares tales como la queratitis (Norcross *et al.*, 2011).

La neumolisina, a diferencia de las otras CDC producidas por, al menos, siete géneros de bacterias Gram-positivas, no contiene un PS para poder ser transportada a través de la membrana citoplásmica. Debido a ello, clásicamente se ha considerado que la Ply se libera al exterior sólo tras la lisis mediada por LytA (Tveten, 2005). Sin embargo, existen evidencias que sugieren que, al menos en algunas cepas, Ply puede secretarse por un mecanismo independiente de LytA (Benton *et al.*, 1997; Balachandran *et al.*, 2001). Además, estudios más recientes han demostrado la presencia de Ply asociada a la pared celular (Price y Camilli, 2009; Price *et al.*, 2012), sugiriendo la existencia, en la liberación de Ply, de mecanismos alternativos a la autólisis causada por LytA. Resulta notable el hecho de que las dos únicas CDC sintetizadas por bacterias Gram-negativas, tampoco posean PS y su mecanismo de transporte sea desconocido (Hotze *et al.*, 2013).

2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

Una vez que se establece la colonización nasofaríngea o estado de portador, la enfermedad neumocócica tiene lugar cuando los microorganismos se diseminan hasta el oído medio, el tracto respiratorio inferior o el torrente circulatorio, provocando otitis media, neumonía y sepsis respectivamente (McCullers y Tuomanen, 2001). Además, *S. pneumoniae* es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica produciendo meningitis, enfermedad que está frecuentemente asociada a graves secuelas neurológicas (Meli *et al.*, 2002). Las neumonías bacteriémicas, la sepsis y las meningitis se consideran como ENI. A pesar de que existen tratamientos antibióticos eficaces frente a la ENI, el hecho de que exista una elevada morbilidad y mortalidad asociadas, demuestra la importancia de la relación patógeno-hospedador en el establecimiento de la enfermedad neumocócica (Preston y Dockrell, 2008; Henriques-Normak y Normak, 2010). Uno de los principales factores que determinan el tipo de relación hospedador-patógeno es el serotipo capsular (Weinberger *et al.*, 2010) de modo que los neumococos de los serotipos 3, 6B y 19F son los más virulentos en adultos, mientras que los de los serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F afectan principalmente a niños (Henriques *et al.*, 2000). Además, como ya se ha comentado anteriormente en esta Memoria, existen otros factores del hospedador que también influyen en la interrelación con el patógeno, tales como la edad (mayor incidencia de enfermedad neumocócica en niños menores de 5 años y adultos mayores de 65) y el estado inmunológico (las personas inmunode-

primidas son más susceptibles a desarrollar ENI). La posible invasión previa del sistema respiratorio por otros agentes patógenos, como el virus de la gripe que potencia la capacidad de neumococo para colonizar, desarrollar la enfermedad o ambas (Wang *et al.*, 2011) o diversos factores genéticos, también aumentan la susceptibilidad del hospedador a sufrir una infección neumocócica (Brouwer *et al.*, 2009). En el proceso de patogénesis neumocócica se pueden distinguir principalmente tres etapas: adhesión/colonización, invasión, e inflamación y choque (*shock*).

2.1. Adhesión y colonización nasofaríngea

La colonización asintomática del tracto respiratorio superior por *S. pneumoniae* (estado de portador) precede, casi de forma invariable, tanto a la enfermedad localizada como a la ENI (Simell *et al.*, 2012). Además, el estado de portador es el principal factor de transmisión horizontal de la enfermedad neumocócica (Malfroot *et al.*, 2004). La colonización por *S. pneumoniae* es un fenómeno muy frecuente en la población mundial con tasas superiores al 40% y con más de un serotipo colonizando simultáneamente al mismo individuo (Austrian, 1986). En la población adulta, los anticuerpos serotipo-específicos se producen después de la adquisición de *S. pneumoniae* y, aunque la bacteria suele ser eliminada al cabo de unas semanas, la colonización puede durar incluso más de un año, en algunos casos (Musher, 1992). Este estado de portación es más prevalente en la población infantil, con más del 50% de los niños menores de 5 años colonizados (Mehr y Wood, 2012) como consecuencia, probablemente, de la inmadurez de su sistema inmune y del alto grado de contacto entre individuos, como sucede en las guarderías.

La adherencia al epitelio de la mucosa es crucial para la persistencia de neumococo en la nasofaringe. Aunque existen factores no específicos, como la carga de la superficie, el pH y las interacciones hidrofóbicas que, probablemente, influyan en dicha adhesión, la unión de *S. pneumoniae* a las células nasofaríngeas se cree que está mediada, en gran parte, por interacciones específicas entre la bacteria y el hospedador (Voß *et al.*, 2012). La cápsula es otro de los factores que influyen en la capacidad de adhesión de neumococo al tracto respiratorio. En presencia de anticuerpos capsulares se reduce la adhesión de neumococo a la nasofaringe por un efecto dependiente del CPS, lo que demuestra que la cápsula se expresa y, de hecho, es necesaria en este ambiente. Sin embargo, la presencia de grandes cantidades de cápsula inhibe la adhesión de la bacteria (Yother, 2011). Además, estudios

de formación de biofilmes de neumococo han demostrado que los diferentes tipos capsulares influyen de un modo diferente en la capacidad de neumococo para formar estas estructuras (Moscoso *et al.*, 2006; Domenech *et al.*, 2009). En el proceso de colonización y adhesión de neumococo intervienen, también, diferentes proteínas bacterianas (Bergmann y Hammerschmidt, 2006; Kadioglu *et al.*, 2008). Se ha sugerido que la adherencia de neumococo a las células de la nasofaringe ocurre mediante interacciones con el disacárido *N*-acetil- β -D-glucosamina (1 \rightarrow 3) β -galactosa de las células epiteliales de la nasofaringe (Andersson *et al.*, 1983). Las proteínas NanA, BgaA y StrH parecen actuar de un modo secuencial sobre los distintos residuos glicosilados, eliminando los residuos de ácido siálico, galactosa y *N*-acetilgalactosamina, respectivamente (King *et al.*, 2006). Esta capacidad de desglicosidar estos residuos de manera secuencial permite hacer accesibles los posibles receptores glicosilados facilitando así el proceso de adhesión a las células del hospedador. Como ya se ha mencionado, otro grupo de proteínas a las que se les ha asignado un papel importante en colonización son las que tienen actividad proteasa, como HtrA, u otras proteínas de la superficie bacteriana como PspC, CbpG, BgaC o las hidrolasas de pared celular LytB, LytC y Pce. La presencia de *pili* en algunas cepas de neumococo es, asimismo, importante en el proceso de adhesión a las células epiteliales pulmonares favoreciendo, además, el proceso inflamatorio de la enfermedad. Una vez que neumococo se localiza en la sangre, la presencia de *pili* parece influir en la gravedad de la patología infecciosa (Barocchi *et al.*, 2006).

2.2. Invasión

El proceso de invasión y diseminación de la ENI es todavía poco conocido. Normalmente ocurre después de la adquisición de un nuevo serotipo y raramente parece asociarse con una portación prolongada. La invasión puede también tener lugar directamente desde la nasofaringe al torrente sanguíneo (McCullers y Tuomanen, 2001). *S. pneumoniae* no puede adherirse al epitelio ciliado del árbol traqueo-bronquial lo que dificulta el acceso a los alveolos pulmonares. Este inconveniente podría explicar, al menos en parte, la relativamente baja incidencia de neumonía comparada con el elevado estado de portador.

Se han descrito varios mecanismos mediante los cuales *S. pneumoniae* es capaz de atravesar la barrera epitelial. El primero de ellos consiste en que la bacteria utiliza un mecanismo mediado por el rPAF, que reconoce la PCho presente en los TAS

y LTAs, activando las células epiteliales y endoteliales (Cundell *et al.*, 1995). El PAF, es una potente quimioquina con actividad pro-inflamatoria cuya estructura molecular consiste en un fosfolípido de gran similitud con la PCho (Demopoulos *et al.*, 1979) que, al unirse a su receptor, provoca un aumento de la permeabilidad endotelial y una extravasación de leucocitos. Debido a la similitud entre el PAF y la PCho de neumococo, *S. pneumoniae* puede unirse al rPAF y atravesar las células epiteliales del hospedador produciéndose la invasión y diseminación característica de la ENI (Cundell *et al.*, 1995; Thornton *et al.*, 2010). Es interesante señalar que la fosforilcolín esterasa de neumococo (Pce) es capaz no sólo de liberar residuos de PCho de la pared celular bacteriana sino, además, de degradar el PAF, por lo que se ha propuesto que esta enzima puede desempeñar un importante papel en la regulación de la virulencia de *S. pneumoniae* (Hermoso *et al.*, 2005). Estudios adicionales utilizando ratones deficientes en rPAF demostraron una reducción no sólo en la colonización neumocócica sino también en el desarrollo de neumonía y ENI, confirmando así la relevancia de este receptor en el proceso invasivo de neumococo (Rijneveld *et al.*, 2004; Grigg, 2012). En este sentido, es interesante resaltar el hecho de que, como consecuencia de la infección de ciertos virus respiratorios como el de la gripe, el virus respiratorio sincitial o el coronavirus NL63, se produce un incremento muy marcado en la biosíntesis de rPAF (Yokota *et al.*, 2010; Golda *et al.*, 2011) que podría estar relacionado con la elevada incidencia de ENI en pacientes que padecen infecciones por estos tipos de virus.

Un segundo mecanismo de invasión consiste en la unión de la proteína PspC a la porción SC del plgR (Elm *et al.*, 2004). En condiciones normales, el plgR, que se expresa ampliamente en las células epiteliales del tracto respiratorio, permite el transporte de las IgA o IgM poliméricas a través de las barreras epiteliales desde la zona basolateral hacia el lumen apical (Kaetzel, 2005; Asano y Komiyama, 2011). Adoptando la maquinaria de transcitosis inversa, la unión de neumococo al plgR, a través de PspC, conduce a la internalización y transcitosis de la bacteria a través de las capas epiteliales. PspC ha demostrado ser un factor importante para la colonización y ENI aunque, como ya se ha comentado, su efecto sobre la virulencia puede variar entre cepas debido al elevado polimorfismo de esta proteína.

Un tercer mecanismo consiste en la invasión mediada por la unión de *S. pneumoniae* al plasminógeno y activación de éste. Neumococo contiene varias proteínas que unen plasminógeno (Tabla 1) favoreciendo así la adhesión de la bacteria a la superficie celular. Además, la activación de plasminógeno a plasmina, mediada por

neumococo, permite degradar la cadherina del endotelio vascular posibilitando el acceso de neumococo a la membrana basal y así, en último extremo, el desarrollo de la ENI (Attali *et al.*, 2008a, b; Dejana *et al.*, 2008).

3. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR

3.1. Inmunidad humoral

3.1.1. El sistema del complemento

El sistema del complemento constituye una de las primeras líneas de defensa del ser humano frente a patógenos microbianos y desempeña un papel fundamental en la respuesta inmune, tanto en la innata como en la adaptativa. Está compuesto por unas 30 proteínas plasmáticas (solubles) y de superficie celular (Walport, 2001a, b) que, tras reconocer al microorganismo invasor, activan una cascada de reacciones. Están presentes tanto en la circulación sanguínea, como en otros fluidos corporales y tejidos. Las nueve proteínas fundamentales del complemento se designan de C1 a C9, de acuerdo con el orden cronológico de su descubrimiento (pero, no necesariamente, con el orden en que actúan). Estas proteínas forman parte de tres cascadas diferentes de activación enzimática denominadas vía clásica, vía alternativa y vía de las lectinas (Fig. 4). Algunas de las proteínas pueden formar parte de más de una vía como, por ejemplo, el componente C4 que es necesario tanto en la vía clásica como en la de las lectinas.

Las tres vías del complemento son cascadas proteolíticas en las que cada componente es activado, mediante hidrólisis, en dos fragmentos. Estos fragmentos son designados con los sufijos “a” y “b”. Por ejemplo, C3 es escindida en dos fragmentos, C3a y C3b. Con la excepción de C2, los fragmentos de mayor tamaño que resultan como productos de hidrólisis de las proteínas del complemento son denominados “b” y los de menor tamaño “a”. Es importante resaltar que el fragmento grande de C2 fue inicialmente denominado C2a y aún es llamado así en algunas publicaciones. En esta tesis, por consistencia, llamaremos “b” a los todos fragmentos grandes y, por tanto, la forma activa del fragmento C2 será designada como C2b.

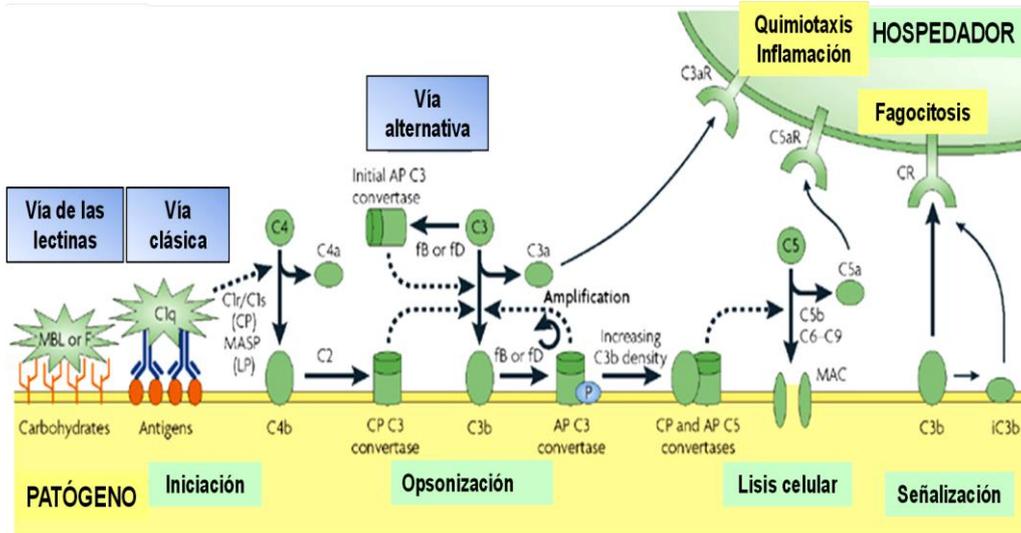


Fig. 4. Activación del sistema de complemento. Adaptado de Lambris *et al.* (2008).

Aunque las tres vías de activación del complemento pueden diferir en su modo de activación, todas convergen en la formación de C3, que es el componente clave del sistema del complemento. Una vez formado el componente C3b, éste se asocia con C5b, C6 y C9 para formar el complejo de ataque a membrana (MAC) que resulta en la formación de poros en la membrana de la bacteria opsonizada; no obstante, hay que señalar que este efecto sólo se ha demostrado en bacterias Gram-negativas debido al menor espesor de su peptidoglicano por lo que, en el caso de neumococo y otras bacterias Gram-positivas, no tiene relevancia (Walport, 2001a, b).

Entre las numerosas funciones fisiológicas en las que participa el sistema del complemento, destaca la opsonización de microorganismos por el componente C3b el cual, al unirse a receptores específicos presentes en las células fagocíticas, facilita la fagocitosis posterior. También es importante la inducción de la respuesta inflamatoria que está mediada por los componentes C3a, C4a y C5a (denominadas

anafilotoxinas) que aumentan la permeabilidad y vasoconstricción vascular con lo que, además, favorecen la migración de las células fagocitarias al sitio de infección.

3.1.1.1. La vía clásica

La vía clásica se activa por la unión de la región Fc de las Igs, a los dominios globulares de la molécula hexamérica C1 (Celik *et al.*, 2001; Walport, 2001a). C1q forma parte del complejo C1 junto con C1r y C1s. El componente C1 puede unirse a las bacterias directamente, mediante unión previa a la proteína C-reactiva (CRP) (Janeway, 2005) o por el hecho de que las IgM naturales se unen al polisacárido C de neumococo (una denominación clásica de los TAs) (Mold *et al.*, 2002). Esta unión provoca la desestabilización de C1q originando la activación de la serín-proteasa C1r y ésta, a su vez, activa la serín-proteasa dimérica C1s la cual hidroliza C4 en C4a y C4b (Joiner *et al.*, 1984; Celik *et al.*, 2001; Walport, 2001a). A continuación, se libera C4a mientras C4b se une a C2 para poder generar la convertasa de C3 (C4b2b) la cual convierte el C3 nativo en C3b. Esta convertasa se encarga, por tanto, de que el C3 activo genere C3b que es capaz de unirse a la superficie del patógeno funcionando como opsonina. El depósito de múltiples moléculas de C3b da lugar a un cambio en la especificidad del sustrato originando la convertasa C5 de la vía clásica, C4b2b (C3b), que se encarga de convertir C5 nativo a C5b. Esto permite, además, que se formen potentes anafilotoxinas como son C3a, C4a y C5a. La actividad de estas anafilotoxinas está regulada por carboxipeptidasas, incluyendo la carboxipeptidasa N que se encuentra en el plasma (Matthews *et al.*, 2004). Los compuestos resultantes poseen actividad antibacteriana por sí mismos. En la última década se ha demostrado que la vía clásica también puede activarse, en ausencia de anticuerpos específicos, por medio de las IgM naturales, las proteínas de fase aguda [CRP, el componente amiloide del suero (SAP), o la pentraxina 3] y la lectina SIGNR-1 (Koppel *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2006; Yuste *et al.*, 2007; Deban *et al.*, 2008). Además, se ha demostrado que la vía clásica del complemento es una de las principales en la inmunidad innata frente a *S. pneumoniae* tanto en el ratón como en los seres humanos, lo que confirma su importancia tanto en el reconocimiento del patógeno como en su eliminación (Brown *et al.*, 2002; Yuste *et al.*, 2008).

3.1.1.2. La vía alternativa

La vía alternativa se activa por la unión del componente C3b (Schwaeble y Reid, 1999), generado espontáneamente por la hidrólisis de C3, al factor B que es una serín-proteasa. Una vez producida esta unión, el factor D se encarga de hidrolizar al factor B para formar la convertasa de la vía alternativa, C3bBb, permitiendo de este modo la amplificación de la activación del complemento. Las moléculas de C3b adyacentes inducen un cambio en la especificidad del sustrato para formar la convertasa C5 de la vía alternativa, C3bBb (C3b)_n. El regulador positivo de la vía alternativa, denominado properdina, estabiliza la convertasa C3bBb y prolonga su actividad. Esta vía se encuentra activada de forma constante, aunque de un modo muy débil. Sin embargo, existen reguladores negativos que, en determinadas ocasiones, pueden interaccionar con C3b evitando así la formación de la convertasa C3bBb e impidiendo que se produzcan fenómenos de autoinmunidad. La importancia de la vía alternativa en la opsonización y eliminación de *S. pneumoniae* se pudo demostrar utilizando ratones con deficiencias en los factores B y D (Xu *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2002).

3.1.1.3. La vía de las lectinas

La vía de las lectinas se inicia cuando las lectinas de unión a manosa (MBLs) o las ficolinas se unen, de un modo dependiente de Ca²⁺, a carbohidratos que contienen residuos de *N*-acetilglucosamina o manosa (Teizo *et al.*, 2004; Endo *et al.*, 2011). Las MBL, también denominadas colectinas, son lectinas de tipo C que forman interacciones múltiples y cuya estabilidad depende de la distribución y geometría de los azúcares. Tanto las MBL como las ficolinas forman complejos con serín-proteasas tipo 2 que permiten la formación de C4 y C2 originando, posteriormente, la misma convertasa de C3 producida a partir de la vía clásica. En el caso de neumococo, se ha observado que la ficolina L es capaz de unirse a determinados serotipos de neumococo como el 11F, 11A y 11D, reconociendo determinados componentes del CPS del serogrupo 11 ya que, en ausencia de la cápsula, no se observó ningún tipo de unión (Krarup *et al.*, 2005; Eisen, 2010). Por su parte, la ficolina M se une al CPS de los serotipos 19A y 19F reconociendo, posiblemente, residuos de *N*-acetilmanosamina (Kjaer *et al.*, 2012). Por otra parte, hay que hacer notar que MBL

y C1q son moléculas estructuralmente similares habiéndose sugerido que también pueden unirse a CR1 estimulando directamente la fagocitosis (Wallis *et al.*, 2010).

Hasta muy recientemente se aceptaba que la vía de las lectinas desempeñaba un papel poco relevante en el desarrollo de la enfermedad neumocócica ya que, por ejemplo, los polimorfismos en MBL, uno de los activadores principales de esta vía, no parecían estar asociados con un mayor riesgo de ENI (Moens *et al.*, 2006). No obstante, otras investigaciones más recientes sí han encontrado una asociación entre la susceptibilidad a la ENI y la homocigosis para uno de los tres polimorfismos del gen *MBL2* (Brouwer *et al.*, 2009; Eisen, 2010). Además, estudios recientes utilizando ratones deficientes en diversas lectinas, han confirmado que estos animales tienen una mayor susceptibilidad a la infección neumocócica (Ali *et al.*, 2012; Endo *et al.*, 2012). Resultados similares han sido encontrados en humanos (Garnacho-Montero *et al.*, 2012; García-Laorden *et al.*, 2013).

3.1.1.4. Reguladores del sistema del complemento

El sistema del complemento es una herramienta muy eficaz para la vigilancia y eliminación de microorganismos patógenos. Sin embargo, su activación descontrolada es nociva para el hospedador y, por ello, este sistema debe estar estrechamente regulado. Existen diferentes reguladores negativos que previenen la activación continua del sistema evitando así la posibilidad de daño celular. En este sentido, la deficiencia en reguladores negativos del complemento permite una activación excesiva del complemento como se observa, por ejemplo, en la hemoglobinuria paroxística nocturna o en el síndrome hemolítico urémico (Risitano, 2012). La regulación del complemento está mediada por componentes solubles localizados en el plasma y por proteínas asociadas a membranas celulares. Los reguladores solubles son C4BP, fH y el inhibidor de C1 (C1INH) que reprimen la activación del complemento al reducir la producción de convertasas de C3. El principal regulador negativo de la vía clásica y de las lectinas es C4BP que es una glicoproteína plasmática de 570 kDa que se une a C4b y actúa como cofactor del factor I (fI) en la hidrólisis de C4b a C4d que es hemolíticamente inactivo. Además, C4BP puede producir una disociación irreversible de la convertasa de C3 de la vía clásica (C4b2b) inactivando de este modo las vías clásica y de las lectinas de manera conjunta (Blom *et al.*, 2003).

El factor H (fH) es el principal regulador negativo de la vía alternativa, controlando la activación del sistema del complemento mediante 3 mecanismos. Por un

lado, actúa como un cofactor de fI en la ruptura e inactivación de C3b a iC3b liberando un pequeño péptido, C3f (Sahu y Lambris, 2001). De este modo iC3b no podría participar en la formación de la convertasa C3. También participa en la inactivación de la vía alternativa al disociar la convertasa de C3 de la vía alternativa (C3bBb) en C3b y factor Bb. Por último, fH es capaz de competir con el factor B por la unión a C3b inactivando también de esta forma la activación de la vía alternativa.

Existen otros reguladores negativos del complemento que son receptores asociados a membranas de las células del hospedador como CR1, CD46, CD55 y CD59. Sin embargo, el papel de estos reguladores está más relacionado con el bloqueo del complemento a nivel celular, para evitar daños patológicos en las células del hospedador (Kim y Song, 2006).

Numerosos microorganismos han desarrollado factores de virulencia que actúan como análogos funcionales de inhibidores del sistema del complemento, con la función de reclutar inhibidores selectivos como una estrategia para evadir la inmunidad mediada por el sistema del complemento facilitando, así, el proceso de infección. De este modo, el mecanismo más frecuentemente utilizado por diferentes microorganismos es la interacción con fH y C4BP (Blom *et al.*, 2009). Neumococo es capaz también de unir estos reguladores negativos, principalmente mediante interacción con la proteína PspC (véase apartado 1.4.2.1) aunque, debido al elevado polimorfismo de esta proteína, la unión a estos inhibidores es muy variable entre unos aislados de neumococo y otros. En el caso de la unión a fH y C4BP, existen otras proteínas que también participan en su reclutamiento aunque de un modo menos eficaz que PspC (Agarwall *et al.*, 2010). La interacción con estos reguladores podría tener implicaciones importantes en el proceso de patogénesis ya que la asociación de determinados serotipos con su invasividad podría deberse a que algunos oligosacáridos capsulares estuvieran afectando la interacción de la bacteria con el fH (Hyams *et al.*, 2013).

3.1.1.5. Inactivación directa de componentes del complemento

Desde el punto de vista de la invasión, la capacidad del patógeno para evitar el ataque del sistema inmune es vital para su supervivencia. Uno de los mecanismos de evasión del sistema del complemento es la producción, por parte del microorganismo, de proteasas capaces de degradar diferentes componentes del sistema. Esta degradación resulta en una inactivación de la cascada y la inhibición de la forma-

ción de complejos del complemento así como de la lisis bacteriana asegurando, de este modo, la supervivencia de la bacteria. El C3 humano es la proteína clave y la más abundante del sistema de complemento en suero (1.2 mg ml^{-1}). Está compuesto por dos cadenas (α y β ; $M_r = 110\,000$ y $75\,000$, respectivamente) unidas covalentemente, por lo que su posible hidrólisis resulta de gran relevancia en el proceso de patogénesis (Sahu y Lambris, 2001). Las proteasas producidas por microorganismos patógenos degradan una gran variedad de sustratos, incluyendo moléculas involucradas en la iniciación del sistema del complemento (como C1q), Igs, el componente C3, así como diversos componentes terminales del sistema del complemento (Potempa y Pike, 2009; Koziel y Potempa, 2013). Por ejemplo, la aureolisina de *S. aureus* —un microorganismo paradigmático en lo que se refiere a desarrollar mecanismos de evasión del sistema inmune— hidroliza el C3 inhibiendo el depósito de C3b sobre la superficie bacteriana y la liberación de C5a, paralizando prácticamente las funciones antibacterianas del sistema del complemento (Laarman *et al.*, 2011). Además, otras proteínas de *S. aureus* son capaces de unirse e inactivar IgGs o incluso de hidrolizarlas, bloqueando así la activación del complemento (Atkins *et al.*, 2008; Brezski *et al.*, 2009; Brezski y Jordan, 2010; Kim *et al.*, 2012). *S. aureus* también expresa la proteína SCIN, que bloquea la activación del complemento al estabilizar la convertasa de C3 en un estado no funcional (García *et al.*, 2012). Además, la proteína inhibidora de quimiotaxis de *S. aureus* (CHIPS) (Ippel *et al.*, 2009) y la proteína SSL7 (Bestebroer *et al.*, 2010) interfieren con moléculas del complemento en etapas tardías de la cascada del mismo.

En el caso de *Streptococcus pyogenes*, la proteína SpeB participa en la degradación directa de C3, inhibiendo las 3 vías de activación del complemento (Kuo *et al.*, 2008; Terao *et al.*, 2008). Además, SpeB es capaz de degradar properdina, una proteína esencial en la estabilización de la convertasa de la vía alternativa (Nelson *et al.*, 2011). Adicionalmente, *S. pyogenes* sintetiza una peptidasa (ScpA) capaz de hidrolizar C5a (Kagawa *et al.*, 2009). Este tipo de peptidasas han sido también detectadas en estreptococos del grupo B (Chmouryguina *et al.*, 1999). Por otra parte, se ha publicado que *S. pneumoniae* podría degradar directamente C3 (Angel *et al.*, 1994), aunque la proteína (o proteínas) implicada en este proceso no ha sido identificada todavía.

3.2. Inmunidad celular

La invasión del hospedador por parte de un patógeno desencadena una serie de interacciones complejas entre un conjunto de moléculas del microorganismo y los sensores del hospedador con el fin de dar lugar a una inducción adecuada de la respuesta inmune mediante redes dinámicas que implican tanto a las células del sistema inmune innato (incluyendo macrófagos, células dendríticas y neutrófilos) como a sus moléculas mediadoras (v. g., el sistema del complemento y los péptidos antimicrobianos) (Kumar *et al.*, 2011, 2012). Las células inmunitarias expresan una familia de receptores innatos o sensores que reciben el nombre de receptores de reconocimiento de patrones (*pattern-recognition receptors*; PRRs) que detectan moléculas características de los agentes patógenos denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) (Fig. 5). Los PAMPs no sólo son esenciales para el establecimiento de la infección sino también para la supervivencia del patógeno. El reconocimiento de los PAMPs por los PRRs dispara rápidamente un conjunto de respuestas inmunes antimicrobianas mediante la producción de citoquinas inflamatorias, quimioquinas e interferones de tipo I así como da lugar al comienzo de una respuesta inmune de tipo adaptativo, patógeno-específica, que involucra a los linfocitos B y T (Kawai y Akira, 2010). Los PRRs incluyen varias familias de moléculas pero, en el caso de neumococo, se admite que los receptores tipo Toll (TLRs) (Kawai y Akira, 2011) y tipo NOD (NLRs) (Kersse *et al.*, 2011; Elinav *e al.*, 2011) son los que están más implicados en la defensa inmune (Albiger *et al.*, 2007a; Koppe *et al.*, 2012).

3.2.1. TLRs

Los TLRs (Fig. 5) constituyen un grupo de receptores transmembranales que reconocen una gran variedad de PAMPs de diferentes microorganismos patógenos e inducen la activación del sistema inmune innato (Janeway y Medzhitov, 2002). La familia de TLRs en seres humanos está constituida por 10 miembros (13 en ratones) y se divide en dos subgrupos dependiendo de su localización celular y del ligando. Un grupo (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11) está compuesto por proteínas de la superficie celular que reconocen componentes de la membrana microbiana tales como lípidos, LPs y proteínas, mientras que las proteínas del segundo grupo (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) se localizan exclusivamente en vesículas intracelulares

como el retículo endoplásmico, los endosomas, lisosomas y endolisosomas, y reconocen ácidos nucleicos microbianos (Kawai y Akira, 2010).

TLR2 participa en el reconocimiento de determinados componentes de la pared celular de neumococo, como los LTAs o las LPs, favoreciendo el proceso de fagocitosis (Schröder *et al.*, 2003; Knapp *et al.*, 2004; Letiembre *et al.*, 2005a, b; van Rossum *et al.*, 2005; Schmeck *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2009). Además, también hay evidencias que sugieren que la unión de neumococo al TLR2 podría favorecer la invasión al alterar la integridad de la barrera epitelial mediada por la interacción de neumococo con TLR2 (Clarke *et al.*, 2011). Por su parte, TLR4 reconoce el lipopolisacárido de las bacterias Gram-negativas, aunque existen algunos estudios que sugieren que TLR4 también podría detectar la Ply de neumococo favoreciendo la producción de citoquinas y la migración de fagocitos al sitio de infección (Malley *et al.*, 2003; Dogan *et al.*, 2011). De hecho, se ha observado que los ratones deficientes en TLR4 son más susceptibles a la infección neumocócica (Malley *et al.*, 2003; Branger *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2005).

TLR9 participa en el reconocimiento y fagocitosis de neumococo (Albiger *et al.*, 2007b) gracias a que detecta, dentro de los endosomas, el DNA microbiano que frecuentemente contiene dinucleótidos CpG no metilados —en contraste con el DNA de mamíferos que es pobre en dinucleótidos CpG y éstos están metilados en su mayoría (Hemmi *et al.*, 2000; Barbalat *et al.*, 2011). La utilización de animales carentes de TLR9 ha permitido demostrar que éstos son más sensibles a la infección, confirmando la importancia de este receptor en la ENI (Ribes *et al.*, 2010). Recientemente, resultados similares han sido observado en niños (Sanders *et al.*, 2011).

Además de los casos anteriores, Oldenburg y cols. (2012) han observado que el TLR13 murino (que no posee equivalente en los seres humanos) es capaz de reconocer una secuencia conservada del rRNA que coincide con el sitio de unión de macrólidos, lincosamida y estreptogramina a bacterias Gram-positivas incluyendo neumococo, notándose que, si dicha secuencia está metilada —como sucede en los casos de resistencia a tales antibióticos—, la estimulación de TLR13 no tiene lugar. Estos resultados indican que, al menos en el caso estudiado, la resistencia antimicrobiana puede acompañarse de la evasión, siquiera parcial, del sistema inmune del hospedador.

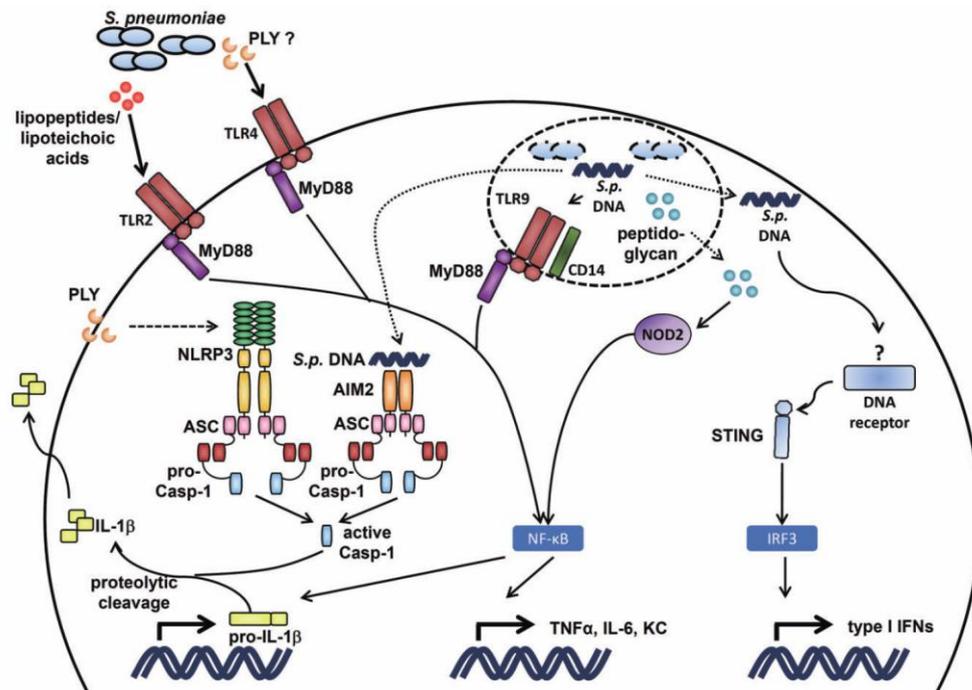


Fig. 5. Representación esquemática de los diferentes PRRs implicados en el reconocimiento de *S. pneumoniae* por el hospedador. Diversos componentes de la pared celular y, posiblemente, Ply son reconocidos por TLR2 y TLR4, respectivamente. Además, *S. pneumoniae* es internalizado por células fagocíticas y degradado en fagosomas permitiendo la liberación de peptidoglicano y ácidos nucleicos (*S.p.* DNA). Mientras que el DNA bacteriano es detectado por TLR9 dentro de los endosomas, otros componentes bacterianos podrían acceder al citosol dependiendo posiblemente de la rotura de la membrana mediada por Ply. Por ejemplo, los fragmentos de peptidoglicano son detectados por NOD2 dentro del citosol. Los TLRs así como NOD2 estimulan la producción de citoquinas dependiente de NF-κB incluyendo TNF α , IL-6, KC y pro-IL-1 β . Mientras que TNF α , IL-6 y KC son liberadas después de la traducción, la producción de IL-1 β requiere la intervención de los inflamasomas NLRP3 y AIM2. Además, el DNA neumocócico puede inducir la producción de interferón de tipo I por un mecanismo aún no completamente conocido. Reproducido de Koppe *et al.* (2012).

3.2.2. NLRs e inflamomas

La familia de NLRs está formada por 22 proteínas citosólicas en seres humanos y 33 en ratones (Chen *et al.*, 2009). Algunos de los NLRs, incluyendo NOD1 y NOD2, activan la respuesta pro-inflamatoria dependiente de NF- κ B. Mientras que NOD1 detecta fragmentos de peptidoglicano principalmente de bacterias Gram-negativas, NOD2 es, básicamente, activado por peptidoglicano de todas las bacterias (Sorbara y Philpott, 2011; Moreira y Zamboni, 2012). Estudios recientes han demostrado que NOD2 activa la fagocitosis de neumococo por un mecanismo relacionado con el reconocimiento del peptidoglicano bacteriano (Davis *et al.*, 2012). De hecho, ratones deficientes en NOD2 muestran una menor respuesta inflamatoria y una menor diseminación meníngea en un modelo de meningitis neumocócica (Liu *et al.*, 2010).

El inflamoma es un complejo citosólico multiprotéico que regula la maduración y liberación de citoquinas pro-inflamatorias de la familia IL-1 en respuesta a patógenos y a señales de peligro internas, incluyendo ATP, cambios en la concentración de potasio, radicales de oxígeno y el ácido úrico liberado en el daño celular producido durante la inflamación (Fig. 5) (Franchi *et al.*, 2009b; Rathinam *et al.*, 2012). Los componentes bacterianos con propiedades activadoras del inflamoma incluyen DNA bacteriano y toxinas del mismo origen. El inflamoma juega un papel crítico en el inicio de la respuesta inmune innata, principalmente actuando como una plataforma para la activación de las caspasas inflamatorias, y se le ha relacionado con las enfermedades respiratorias agudas y crónicas. El inflamoma puede ser activado por los patógenos responsables de la mayoría de enfermedades infecciosas prevalentes del tracto respiratorio, como el virus A de la gripe, *S. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*. Además, el inflamoma desempeña un papel esencial en la inflamación crónica de las vías respiratorias de pacientes con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica, así como en el inicio y progresión del proceso inflamatorio en la fibrosis pulmonar (dos Santos *et al.*, 2012).

Se han descrito varios inflamomas cada uno de los cuales contiene una única proteína sensora de las superfamilias NLR o PYHIN (von Moltke *et al.*, 2013). El resultado principal de la activación del inflamoma es la unión y la activación de la caspasa-1 (Franchi *et al.*, 2009a; Rathinam *et al.*, 2012). La caspasa-1 activa contribuye a la conversión de la pro-IL-1 beta (pro-IL-1 β) y la pro-IL-18 en sus respectivas citoquinas activas y secretadas (Lamkanfi y Dixit, 2011; Schroder *et al.*, 2010;

Stutz *et al.*, 2009). Mientras que el papel de IL-1 β aún no ha sido descrito en la patogénesis de neumococo, varios efectos clínicos han sido atribuidos a los procesos mediados por caspasa-1, IL-1 β , y IL-18 (Hoegen *et al.*, 2011; Koedel *et al.*, 2002; Mook-Kanamori *et al.*, 2011; Saukkonen *et al.*, 1990).

3.2.3. Fagocitosis

Las células fagocíticas “profesionales”, tales como neutrófilos y macrófagos o las células dendríticas, desempeñan un papel esencial en la eliminación de las infecciones producidas por muchos microorganismos y, en particular, por *S. pneumoniae*, mediante su fagocitosis y posterior eliminación. La neutropenia, tanto la adquirida como la hereditaria, así como una disfunción de los neutrófilos propician infecciones recurrentes, producidas principalmente por hongos y bacterias (para dos revisiones recientes, véase Croker *et al.*, 2012 y Verschoor *et al.*, 2012). Este hecho demuestra la importancia de los neutrófilos en el proceso de defensa del hospedador. Tras un primer contacto con el microorganismo invasor, los fagocitos internalizan los patógenos en vacuolas derivadas de la membrana plasmática denominadas fagosomas. Después de la escisión de la membrana, los fagosomas sufren un proceso complejo de maduración fusionándose secuencialmente con endosomas y lisosomas y, finalmente, dando lugar a los denominados fagolisosomas, unos orgánulos muy ácidos (pH \cong 4.5) y ricos en hidrolasas que degradan las bacterias internalizadas (Botelho y Grinstein, 2011; Fairn y Grinstein, 2012). En los fagolisosomas, los patógenos son eliminados por una combinación de mecanismos oxidativos y no oxidativos (Dahlgren y Karlsson, 1999; Urban *et al.*, 2006; Nauseef, 2007; Robinson, 2009).

3.2.3.1. Las selectinas

Las selectinas son moléculas que pertenecen a un grupo de proteínas de membrana encargadas de mediar las interacciones célula-célula o célula-matriz. El reclutamiento de los leucocitos al lugar de inflamación durante la respuesta inflamatoria, depende básicamente de la adhesión de los leucocitos circulantes a las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Esta adhesión inicial está mediada por las selectinas y sus ligandos en un proceso con múltiples pasos denominado *rolling* (Vestweber y Blanks, 1999). Las selectinas son lectinas dependientes de Ca²⁺ que

se expresan en el sistema vascular. Esta familia está integrada por tres tipos de lectinas, P-selectinas, L-selectinas y E-selectinas (Kansas, 1996). Las tres selectinas comparten motivos estructurales comunes, incluyendo una región consenso repetida, un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico, y un dominio dependiente de calcio (Kansas, 1996). Mientras que la L-selectina se expresa de modo constitutivo en leucocitos, las E- y P-selectinas son inducidas en respuesta a estímulos inflamatorios como $TNF\alpha$ e IL-1 en células endoteliales activadas y en plaquetas (Tedder *et al.*, 1995). La pérdida de función de las moléculas de adhesión en los leucocitos da lugar a deficiencias en la adhesión, las cuales se asocian con infecciones bacterianas recurrentes debido a un reclutamiento de leucocitos fallido hacia el tejido dañado o infectado (Etzioni, 2007). Se ha demostrado que ratones con mutaciones en alguna selectina no desarrollan enfermedad espontánea y no presentan deficiencias en la respuesta inflamatoria aunque son más sensibles a la infección sistémica por neumococo (Bullard *et al.*, 1996). Además, los ratones que poseen mutaciones en las selectinas P y E simultáneamente desarrollan un fenotipo con deficiencias en la adhesión de los leucocitos, ausencia de migración de neutrófilos en fases tempranas de la sepsis neumocócica y mayor susceptibilidad a la infección por *S. pneumoniae*, lo que demuestra la importancia fisiológica de las selectinas (Bullard *et al.*, 1996; Munoz *et al.*, 1997). El principal ligando de selectinas que se encuentra en la superficie de los leucocitos y que puede unirse a los tres tipos de selectinas es el ligando de glicoproteína P-selectina -1 (PSGL-1). PSGL-1 es una sialomucina homodimérica de 220 kDa que se localiza preferentemente en las balsas lipídicas. PSGL-1 posee un dominio extracelular, un dominio transmembrana y uno citoplásmico (McEver y Cummings, 1997).

El proceso de señalización de PSGL-1 ha sido ampliamente estudiado por diversos autores (Fig. 6). Este receptor activa el inicio de las señales intracelulares en los leucocitos, promoviendo su adhesión a las células endoteliales e induciendo la activación transcripcional de factores de transcripción como los cFos, alterando de este modo el estado de activación de los leucocitos (Hidari *et al.*, 1997; Urzainqui *et al.*, 2002; Zarbock *et al.*, 2008). Además, en el caso de las células dendríticas, se ha visto que PSGL-1 induce un programa tolerogénico capaz de producir la diferenciación de linfocitos T inmaduros a células reguladoras T (Urzainqui *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha confirmado que ratones deficientes en PSGL-1 muestran una mayor morbi-mortalidad en un modelo de gastroenteritis aguda inducida por *Salmonella*,

mostrando un incremento en la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias (Kum *et al.*, 2009).

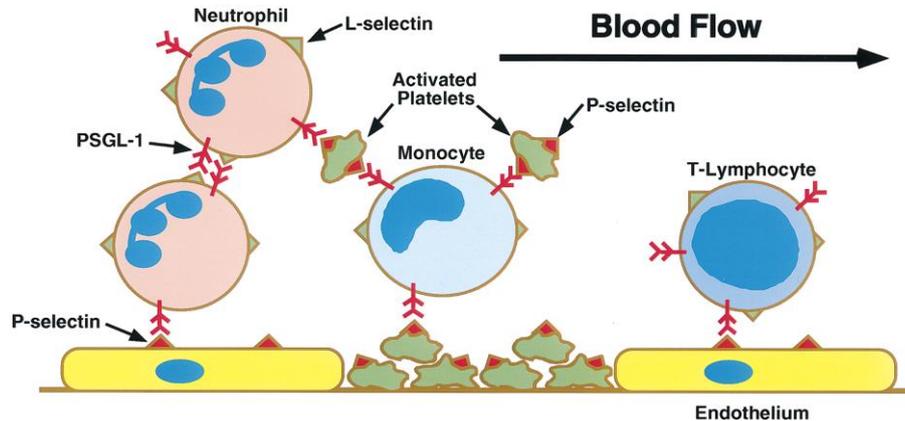


Fig. 6. Modelo de interacción de P- y L-selectina con PSGL-1. La unión de PSGL-1 a P-selectina promueve la unión de leucocitos A y el *rolling* de los mismos sobre células endoteliales activadas y plaquetas. La unión de la L-selectina está implicada en la unión entre leucocitos, los cuales pueden amplificar su reclutamiento a la pared vascular. Las plaquetas activadas pueden, a través de interacciones P-selectina-PSGL-1, conectar leucocitos adicionales a los sitios de inflamación.

PSGL-1 se ha descrito como el receptor responsable de la entrada de *Anaplasma phagocytophilum* en neutrófilos. *A. phagocytophilum* es una bacteria intracelular obligada que infecta granulocitos provocando anaplasmosis granulocítica en la especie humana. La susceptibilidad de neutrófilos humanos y células HL-60 (que expresan este receptor) a esta bacteria se ha relacionado con la utilización de PSGL-1 como receptor para la adhesión y entrada por parte de la bacteria (Goodman *et al.*, 1999; Herron *et al.*, 2000; Troese y Carlyon, 2009). Este receptor también es utilizado como vía de entrada en el caso del enterovirus 71, que es el agente etiológico de la enfermedad de manos, pies y boca (Nishimura *et al.*, 2009).

4. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO

4.1. Prevención

Los primeros esfuerzos llevados a cabo para prevenir la ENI mediante la utilización de vacunas eficaces fueron llevados a cabo a comienzos del pasado siglo, primero con trabajadores de las minas de oro en Sudáfrica (Wright *et al.*, 1914 a, b; Maynard, 1915; Lister, 1916, 1917) y, poco más tarde, con militares en EE.UU. (Cecil y Austin, 1918). Sin embargo, estos primeros ensayos, que utilizaban mezclas de neumococos muertos por calor, tuvieron un éxito limitado porque, en aquellos tiempos, se desconocía la enorme variabilidad serológica de neumococo. La posibilidad de desarrollar vacunas compuestas por polisacáridos capsulares purificados se planteó sobre bases más sólidas de manera casi simultánea a los estudios antes mencionados basándose, principalmente, en los hallazgos de Avery y colaboradores en Nueva York. Estos investigadores fueron los primeros en aislar e identificar la cápsula de neumococo como una sustancia de naturaleza polisacáridica que cubría la superficie de la bacteria (Heidelberger y Avery, 1923, 1924; Heidelberger *et al.*, 1925). En el proceso de desarrollo de vacunas eficaces contra *S. pneumoniae* resultó esencial el reconocimiento de que los anticuerpos frente a un serotipo capsular protegían de una infección posterior causada por cepas del mismo serotipo o de serotipos que presentasen alguna reacción cruzada con aquel (Avery y Goebel, 1933). Estos trabajos culminaron con la elaboración de una vacuna antineumocócica 4-valente que incluía los CPS de los serotipos 1, 2, 5 y 7 (McLeod *et al.*, 1945) y que fue, sin embargo, raramente utilizada posteriormente debido a la elevada eficacia terapéutica de la penicilina (PEN) que había sido descubierta poco antes.

De manera simultánea a la investigación en vacunas y antes de la aparición de las primeras sulfamidas y de la PEN, se utilizaban sueros antineumocócicos como tratamiento frente a la enfermedad neumocócica y, fundamentalmente, contra la neumonía. La terapia humana con dicho suero se justificaba por su capacidad para proteger a animales de experimentación frente a una infección letal con neumococo (Casadevall y Scharff, 1995). Para la producción de anticuerpos antineumocócicos se utilizaron diversos animales. La producción de suero inmune en caballos necesitaba meses y el coste derivado del cuidado de los animales, la purificación de anticuerpos y los estudios de protección en ratones hizo que la sueroterapia tuviese un coste considerable. El suero de conejo ofrecía ciertas ventajas sobre el de caballo y

sobre el de ratones como mayor especificidad y menores costes (Casadevall y Scharff, 1994). La sueroterapia era más efectiva si se iniciaba en los tres primeros días de desarrollo de la neumonía neumocócica. Aunque a veces se utilizó la vía subcutánea o intramuscular con el fin de reducir algunas reacciones adversas, en general se prefirió la administración intravenosa (iv) debido a su mayor efectividad. El tratamiento con suero antineumocócico en la era preantibiótica redujo la mortalidad de la neumonía neumocócica desde el 30–40% hasta un 10–20%, aunque la utilización de estos sueros mostraba una elevada toxicidad, provocando reacciones de anafilaxia, fiebre y el síndrome del suero caracterizado por malestar, erupciones cutáneas y artralgias que aparecían a los 7–10 días de la terapia (Casadevall y Scharff, 1994). Como ya se ha comentado, la introducción de las penicilinas de forma rutinaria en el tratamiento de las infecciones por neumococo resultó en un descenso casi total del interés por estos temas. Sin embargo en la década de los 60, Austrian y colaboradores observaron que, a pesar de la aparente eficacia terapéutica de la PEN *in vitro*, la neumonía neumocócica causaba más muertes en EE.UU. que ninguna otra enfermedad infecciosa (Austrian y Gold, 1964). Esta observación permitió al Instituto Nacional de la Salud (NIH) recomendar la financiación con fondos gubernamentales del desarrollo de vacunas frente a neumococo invirtiendo más de 6 millones de dólares para este fin. Este hecho, junto a la emergencia de neumococos multirresistentes, dio lugar a un nuevo interés por la vacunación frente a neumococo.

4.1.1. Vacunas constituidas por polisacárido capsular

Debido a que ciertos serotipos eran los más frecuentes en la ENI, se desarrolló una vacuna compuesta por los tipos capsulares más prevalentes, que en un principio constaba de 14 (14-valente) (Austrian *et al.*, 1976) y, más tarde, de 23 polisacáridos capsulares. La actual vacuna polisacáridica 23-valente comercializada, contiene polisacáridos capsulares de los serotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F. Esta vacuna reduce el riesgo de infección sistémica en la población adulta y, de hecho, se utiliza en la actualidad en la inmunización de adultos. Sin embargo, el empleo de esta vacuna en niños menores de 2 años, que son uno de los principales grupos de riesgo de ENI, no se utiliza debido a la pobre inmunogenicidad que genera ya que los niños con esas

edades no responden a los polisacáridos capsulares por ser antígenos de tipo T-independientes (Pomat *et al.*, 1994).

4.1.2. Vacunas conjugadas

La introducción de las vacunas polisacáridicas frente a neumococo estaba dirigida principalmente a combatir la ENI de la población adulta. Sin embargo, se estima que cada año mueren cerca de 2 millones de niños menores de 5 años en todo el mundo como consecuencia de neumonías infecciosas siendo neumococo la principal causa (Wardlaw *et al.*, 2006). Como se ha comentado, la población infantil, presenta una respuesta muy pobre frente al polisacárido capsular purificado. Las vacunas conjugadas utilizan, como antígeno, un oligosacárido o polisacárido capsular, al que se une de forma covalente una fracción proteica (proteína portadora) para aumentar su capacidad inmunogénica. Esta unión transforma el comportamiento T-independiente del polisacárido en T-dependiente, lo que posibilita una respuesta inmune efectiva a partir de los dos meses de vida y una memoria inmune permanente (Lesinski y Westerink, 2001). Como proteínas utilizadas en la conjugación se suele utilizar el toxoide diftérico CRM₁₉₇ —una proteína de la membrana externa de meningococo B— o el toxoide tetánico. En febrero del año 2000, la *US Food and Drugs Administration* aprobó la vacuna neumocócica conjugada 7-valente (PCV7), en la que se incluye la proteína transportadora CRM₁₉₇ para su uso en niños y bebés, proporcionando así una herramienta clave para la prevención de la enfermedad neumocócica pediátrica. Esta vacuna incluía los serotipos más frecuentes que producían ENI en Estados Unidos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F). La introducción de la vacuna conjugada heptavalente (Prevenar®) en el calendario vacunal infantil de EE.UU. y Europa, permitió una rápida disminución tanto de los casos de otitis media aguda (Fletcher y Fritzell, 2007) como los de ENI provocados por los serotipos incluidos en la vacuna (Fenoll *et al.*, 2009). Sin embargo, la colonización por neumococo no disminuyó significativamente debido a la aparición de un reemplazo de los serotipos antes más frecuentes por serotipos no incluidos en la PCV7, en particular el producido por el serotipo 19A cuya prevalencia en enfermedad infantil se ha incrementado considerablemente (Pilishvili *et al.*, 2010; Reinert *et al.*, 2010). Para combatir este reemplazamiento de serotipos, se inició el desarrollo de vacunas con una mejor cobertura, culminando en la comercialización de las vacunas 10-valente (denominada Synflorix™; GlaxoSmithKline) y 13-valente (Prevenar-13®;

Pfizer) (PCV13) que incluyen los CPS de 10 y 13 serotipos, respectivamente. Estas vacunas contienen además de los siete serotipos de la PCV7, los serotipos 1, 5 y 7F en la vacuna Synflorix y los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A en la PCV13. Para incrementar la cobertura de serotipos, Merck ha desarrollado una vacuna conjugada 15-valente que contiene el CPS de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F, conjugados a CRM₁₉₇ y formulada con fosfato de aluminio como adyuvante, aunque todavía está en fase de evaluación (Skinner *et al.*, 2011).

4.1.3. Vacunas basadas en proteínas

El desarrollo, comercialización y administración de las vacunas polisacáridicas y conjugadas de neumococo son de gran utilidad en salud pública y continúan siendo una herramienta muy útil frente a las infecciones por neumococo. Sin embargo, estas vacunas proporcionan protección sólo frente a determinados serotipos (los incluidos en la misma y, en ciertos casos, alguno más con reacción cruzada) y, además, desde el punto de vista de su producción, el número de CPS diferentes que se pueden conjugar es limitado. A esto hay que sumarle los elevados costes de la vacuna que impiden su implementación en la mayoría de países en vías de desarrollo. Por ello, existen numerosos grupos en todo el mundo cuyas investigaciones están enfocadas a la búsqueda de la vacuna ideal de neumococo basada en proteínas de la bacteria que sean comunes a todos o la gran mayoría de aislados clínicos, que estén bien conservadas y que confieran inmunogenicidad.

Diferentes proteínas antigénicas de neumococo han sido descritas como posibles candidatas a formar parte de una vacuna de naturaleza proteica; entre ellas, Ply, PspC, PspA, PsaA, PiaA, PhtB, PhtE (BVH-3) y NanA (Lebon *et al.*, 2011). Sin embargo, al menos hasta ahora, ninguna de ellas ha sido considerada como un candidato adecuado para proporcionar protección suficiente cuando se utiliza de forma individualizada. Una posible explicación podría deberse al marcado polimorfismo de algunas de ellas (Briles *et al.*, 1998; Iannelli *et al.*, 2002). En cualquier caso, la combinación de proteínas se considera que es el futuro en el desarrollo de las nuevas estrategias de vacunas de naturaleza proteica, ya que existen evidencias que demuestran que ciertas combinaciones de proteínas proporcionan un efecto aditivo, o incluso sinérgico, en términos de inmunoprotección (Ogunniyi *et al.*, 2007; Lebon *et al.*, 2011).

4.2. Tratamiento antibiótico

4.2.1. Antibióticos β -lactámicos

Bajo la denominación de β -lactámicos se agrupa un número de antibióticos continuamente creciente cuyo origen se remonta a 1929, cuando Fleming descubrió que un hongo del género *Penicillium* producía una sustancia, posteriormente denominada penicilina por él mismo, capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* (Fleming, 1929). La familia de las cefalosporinas se inició en 1948 cuando Brotzu obtuvo, a partir del hongo *Cephalosporium acremonium*, material activo frente a *S. aureus*. Actualmente, penicilinas y cefalosporinas forman uno de los grupos de antibióticos más amplio en número y de mayor importancia en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. La importancia de estos antimicrobianos en la terapéutica antimicrobiana se debe a los siguientes factores: a) Su potente acción antibacteriana, de carácter bactericida; b) el amplio espectro de acción de muchos derivados; c) la existencia de preparados que resisten la inactivación enzimática inducida por las bacterias y de inhibidores enzimáticos con o sin actividad antibacteriana propia; d) la presencia de características farmacocinéticas favorables: absorción oral, buena difusión tisular y aumento muy notable de la semivida logrado con algunos derivados; e) la producción de escasos efectos adversos.

Dentro de esta familia de antibióticos destacan la amoxicilina (AMX), como miembro más utilizado del grupo de las penicilinas, así como la cefotaxima (CTX) y ceftriaxona (CRO), dentro del grupo de las cefalosporinas, por su amplia utilización en el tratamiento parenteral de la ENI a nivel hospitalario. Dentro del grupo de las cefalosporinas, una de las alternativas por vía oral —aunque también puede administrarse por vía parenteral— es el cefditoren (CDN) que presenta una buena actividad frente a neumococo (Yamada *et al.*, 2007).

4.2.2. Macrólidos

Los macrólidos son un grupo de antibióticos muy relacionadas entre sí que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de lactona con 14–16 miembros y cuyo prototipo, y el macrólido más utilizado, es la eritromicina (ERY). ERY fue el primer macrólido, descubierto en 1952 por McGuire y colaboradores, en los productos metabólicos de una cepa de *Streptomyces erythreus* (en la actualidad, *Saccharo-*

polyspora erythraea), obtenido originalmente de una muestra de tierra recolectada en Filipinas, y es el antibiótico de elección en pacientes alérgicos a las penicilinas. Los macrólidos inhiben la síntesis proteica mediante la unión a la subunidad ribosómica 50S, inhibiendo la translocación del aminoacil-tRNA. Tiene también efectos a nivel de la peptidiltransferasa. Sus acciones pueden provocar un efecto bacteriostático o bactericida, según la especie bacteriana atacada, la concentración del antibiótico alcanzada en el sitio de infección o la fase de crecimiento en que se encuentran las bacterias durante el ataque del antibiótico. Los macrólidos ejercen su efecto sólo en los microorganismos que se encuentran en proceso de replicación y penetran más fácilmente en las bacterias Gram-positivas. La claritromicina y la azitromicina (AZM) son derivados sintéticos de la ERY que presentan modificaciones estructurales que les permite una mayor potencia contra bacterias Gram-negativas, además de poseer resistencia a la degradación mediada por el pH ácido en el jugo gástrico y penetrar mejor en los tejidos. Otros macrólidos menos comunes, aunque no por ello menos importantes, incluyen la midecamicina (MDM) o miocamicina. Uno de los principales inconvenientes en el uso de los macrólidos es la aparición de resistencias que, en el caso de España son elevadas, alcanzando porcentajes entre el 30 y el 50% (Pérez-Trallero *et al.*, 2005).

4.2.3. Quinolonas

Las quinolonas son un grupo de antibióticos bactericidas de amplio espectro. La mayor parte de las quinolonas usadas en la clínica son del grupo de las fluoroquinolonas, caracterizadas por tener un grupo fluoruro en el anillo central, normalmente en posición 6. Las quinolonas interfieren en la replicación del DNA al bloquear o inhibir la acción de la DNA girasa (Wolfson y Hooper, 1989). Las primeras quinolonas que se utilizaron en clínica fueron el ácido nalidíxico y el ácido pipemídico. Luego surgieron el norfloxacin, el ciprofloxacino y, entre las últimas, destacan el levofloxacino (LVX) y el moxifloxacino. La diferencia más sustancial entre las dos primeras y el resto es el espectro de acción, ya que las últimas actúan sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas mientras que las primeras que se sintetizaron actuaban exclusivamente sobre bacterias Gram-negativas.

4.3. Resistencias a los antibióticos

La exposición de las bacterias a los antibióticos conlleva inevitablemente la adquisición de resistencias. Durante las pasadas tres décadas, las resistencias antimicrobianas se han incrementado de un modo dramático. Este es un hecho especialmente importante en *S. pneumoniae*, que posee capacidad transformante de modo natural para adquirir resistencias por transferencia horizontal de genes, permitiendo así una rápida diseminación (Witte, 1999). A todo esto se le suma la alta capacidad que tiene neumococo para colonizar la nasofaringe humana durante meses y la consecuente posibilidad de exposición a diferentes antibióticos frente a los que puede desarrollar resistencias. Como ya se ha señalado, la introducción de la vacuna conjugada heptavalente se asoció con un significativo descenso en las tasas de resistencia antibiótica en *S. pneumoniae* en muchos países, incluida España (Fig. 7). Sin embargo, en los últimos años, se ha producido un incremento de los serotipos no incluidos en la PCV7, especialmente en el serotipo 19A que está frecuentemente asociado a resistencia antibiótica (Liñares *et al.*, 2010).

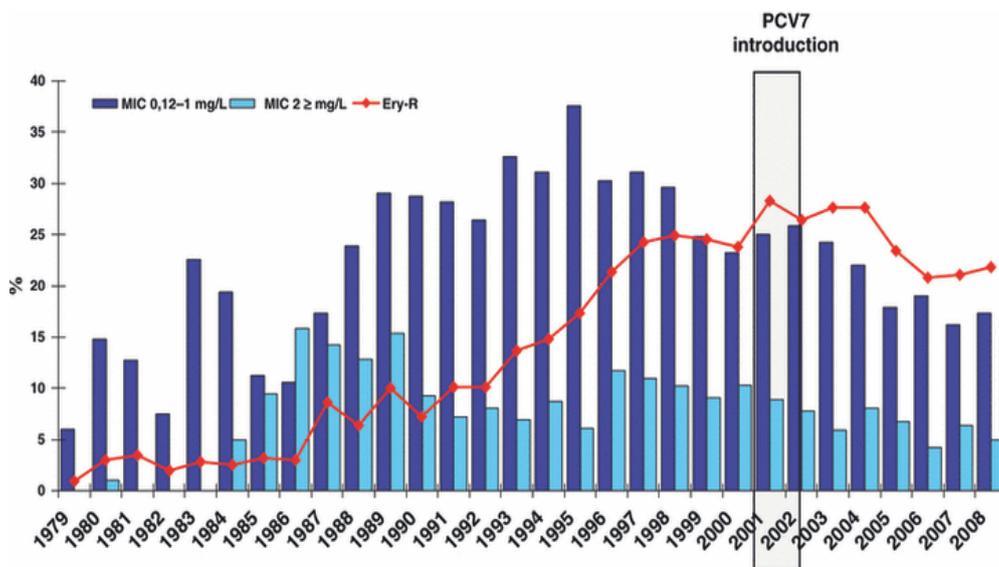


Fig. 7. Tendencias en la resistencia a ERY y a PEN en 19266 aislados neumocócicos invasivos en pacientes de todas las edades en España (1979-2008). Las barras azules corresponden a la resistencia a PEN en los rangos indicados. Ery-R, eritromicín-resistente. Reproducido de Liñares *et al.* (2010).

La resistencia antibiótica afecta a diferentes antimicrobianos, incluyendo a los β -lactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas (Feldman y Anderson, 2011). Las cepas con sensibilidad reducida a PEN han sido investigadas desde los años sesenta. Este tipo de resistencias surgen, principalmente, por una modificación de las proteínas de unión a PEN o PBPs. La similitud estructural que existe entre el anillo β -lactámico y el sustrato de la transpeptidación —el extremo carboxi-terminal de los péptidos del peptidoglicano, D-Alanil-D-Alanina, permite al antibiótico bloquear la síntesis de la pared celular (García, 2009). Estos cambios resultan en una reducida afinidad tanto para las penicilinas como para otros β -lactámicos. Sin embargo, la CRO, CTX y carbapenemes, son menos afectados y, por ello, son generalmente los compuestos más activos (Pilishvili *et al.*, 2010). El primer neumococo no susceptible a PEN fue descrito en EE.UU. y Australia en 1967, más tarde en Papúa-Nueva Guinea (1974), Sudáfrica (1977) y España (1979) (García, 2009). La mayoría de estas cepas eran, además, resistentes a otros antibióticos y pertenecían a los serotipos 6A, 6B, 19, 19F y 23F. Excepto para las fluoroquinolonas, cuyas tasas de resistencia en todo el mundo son inferiores al 2,5%, la actual resistencia antibiótica en neumococo depende de factores geográficos, consumo de antibióticos y de la introducción de las vacunas conjugadas. La emergencia de resistencia a amoxicilina en determinados clones resistentes a PEN (PEN^R) se ha observado tanto en los serotipos incluidos como en los no incluidos en la PCV7 (Pérez-Trallero *et al.*, 2007). De hecho, en 2008, se describió un grupo de cepas de neumococo con concentraciones mínima inhibitorias (CMI) a PEN, AMX y CTX $\geq 16 \mu\text{g ml}^{-1}$, representando una seria amenaza para el tratamiento de la ENI (Soriano *et al.*, 2008).

La resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* está mediada por dos mecanismos. El primero es la modificación de la diana, debido a una metilasa ribosómica codificada por el gen *ermC* que confiere altos niveles de resistencia a macrólidos, lincosamidas, y estreptogramina B. En *S. pneumoniae* y especies relacionadas, la frecuencia de asociación de resistencia a ERY y tetraciclina (TET) está a menudo relacionada con la inserción de *ermC* en un transposón conjugativo de la familia Tn916 (Courvalin y Carlier, 1987; Brenciani *et al.*, 2007). El segundo mecanismo de resistencia a macrólidos es un sistema de bomba de flujo codificado por el gen *mef* que también confiere resistencia a numerosos miembros de la familia de los macrólidos (Leclercq y Courvalin, 2002).

La resistencia a fluoroquinolonas está codificada por mutaciones en los genes *parC* o *parE* de la topoisomerasa IV así como en el gen *gyrA* de la DNA girasa. Es-

tas mutaciones pueden darse de forma combinada o por separado. Las cepas que presentan una mutación en la topoisomerasa IV muestran una susceptibilidad disminuida a fluoroquinolonas. Mutaciones adicionales en la DNA girasa dan lugar a una resistencia mucho más elevada. La resistencia también puede ser adquirida por recombinación intra- o inter-específica con SGM (de la Campa *et al.*, 2004, 2009). Hay que señalar el hecho de que, a pesar de la baja resistencia detectada a fluoroquinolonas (en torno a un 2%) existen varios estudios en los que se han observado fallos terapéuticos (Chen *et al.*, 2009; Liñares *et al.*, 2010).

5. MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

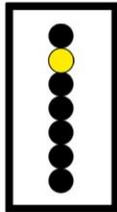
La experimentación animal es una herramienta esencial para el estudio de las enfermedades infecciosas. Actualmente, existen disponibles diferentes modelos animales para analizar las diversas enfermedades causadas por *S. pneumoniae* con el fin de evaluar mecanismos implicados en patogénesis, probar nuevos compuestos antimicrobianos, así como caracterizar posibles candidatos a vacunas (Chiavolini *et al.*, 2008). La elección tanto del modelo animal como de la cepa bacteriana debería ser considerada de forma muy cuidadosa ya que hay diferentes factores que pueden afectar a los resultados.

Las cepas consanguíneas (*inbred*) de ratas y ratones dan lugar a respuestas más uniformes a los tratamientos experimentales debido a que presentan un sistema inmune más homogéneo. Por esta razón, estos ratones han sido ampliamente empleados como modelos de infección, vacunación y estudios de eficacia de nuevos compuestos. Entre ellas se incluyen las cepas de ratones BALB/c, C57BL/6, DBA, y CBA. Sin embargo, las cepas no consanguíneas o *outbred* dan lugar a la máxima heterogeneidad. Esta diversidad fenotípica puede ser de gran importancia a la hora de imitar la variabilidad natural en respuesta a la infección y, por ello, se utilizan frecuentemente en modelos de patogénesis. En este grupo se incluyen las especies de ratas Wistar y Sprague-Dawley, así como los ratones CD-1 o Swiss. El conejo blanco (New Zealand) es la cepa de conejo más usada para inducir ENI. Finalmente, las chinchillas, jerbos y cobayas, son comúnmente utilizados como modelos de experimentación en estudios de otitis media.

Al igual que ocurre con el hospedador y dependiendo de la cepa de neumococo utilizada, existe una gran variabilidad en la infección causada por *S. pneumoniae* en los modelos experimentales. Entre las cepas de neumococo más utilizadas en mo-

INTRODUCCIÓN

delos de patogenicidad en todo el mundo destacan las cepas D39 (serotipo 2; Lanie *et al.*, 2007) y la cepa TIGR4 de serotipo 4 (Tettelin *et al.*, 2001). La virulencia de neumococo, tanto en seres humanos como en ratones, se ve afectada por el serotipo capsular. En general, los serotipos de neumococo asociados a resistencia antibiótica suelen ser mucho menos virulentos, en modelos animales, que los serotipos sensibles (Briles *et al.*, 1992). Así, los neumococos de los serotipos 2, 3, 4, 5 y 6 suelen ser virulentos en ratones, mientras que los de serotipos 9V, 14, 19 y 23 son relativamente avirulentos (Benton *et al.*, 1997).



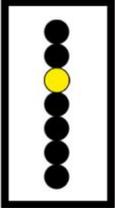
II. OBJETIVOS

S. pneumoniae es uno de los principales patógenos causantes de enfermedad invasiva en todo el mundo y, además, coloniza la nasofaringe humana de forma habitual. La colonización implica la unión de la bacteria a moléculas presentes en la superficie de las células del hospedador y está mediada por diversas proteínas de la pared celular bacteriana. Las hidrolasas de pared celular son enzimas de superficie que rompen diversos enlaces covalentes del peptidoglicano. Entre ellas se encuentran LytA, LytB y LytC que, aunque son proteínas bien caracterizadas *in vitro*, el papel que desempeñan en la interacción directa con las superficies del hospedador o en el establecimiento de la patogénesis de neumococo no es del todo claro.

El desarrollo de las infecciones causadas por *S. pneumoniae* en humanos depende, fundamentalmente, de la vía humoral del sistema inmune ya que, la fagocitosis dependiente de anticuerpos y opsoninas, es el principal mecanismo de defensa frente a este patógeno pero, además, la infección depende de un tratamiento antibiótico adecuado. Las defensas naturales y los antibióticos pueden actuar conjuntamente en la pared celular del patógeno. Por ello, el conocimiento detallado de las interacciones entre antibióticos y proteínas del suero es esencial en la determinación de las implicaciones farmacodinámicas sobre la actividad bacteriana.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los objetivos que nos planteamos en esta tesis doctoral son los siguientes:

- 1. Estudiar las bases moleculares de la patogénesis de neumococo mediada por las hidrolasas de pared celular LytB y LytC.**
- 2. Determinar el papel de la autolisina LytA en la evasión, por parte del patógeno, de los mecanismos de defensa del hospedador y evaluar el papel de neumolisina en la patogénesis mediada por LytA.**
- 3. Investigar la implicación del receptor PSGL-1 en la infección neumocócica.**
- 4. Analizar el efecto inmunomodulador de diferentes grupos de antimicrobianos en aislados clínicos de neumococo con altos niveles de resistencia antibiótica.**



III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. CEPAS BACTERIANAS Y CRECIMIENTO

1.1. Estirpes bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Además de las cepas de *Escherichia coli* RB791, BL21 (DE3) y ATCC 25922 y de *Morganella morganii* ATCC 8076H, las estirpes bacterianas, los plásmidos y los oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de esta Tesis están detallados en las Tablas 2 a 5.

Tabla 2. Estirpes bacterianas de *S. pneumoniae*

Cepa	Descripción ^a	Referencia/Origen
D39 ^b	S2 ⁺	Lanie <i>et al.</i> , 2007
TIGR4	S4 ⁺	Tettelin <i>et al.</i> , 2001
P026	TIGR4, <i>lytA::aphIII</i> KAN ^R	Moscoso <i>et al.</i> , 2005a
P027	TIGR4, <i>lytA::cat</i> CHL ^R	Moscoso y Claverys, 2004
P031	TIGR4, <i>lytA::aphIII</i> ; KAN ^R , <i>lytC::tet</i> , KAN ^R , TET ^R	Moscoso <i>et al.</i> , 2005a
P036	TIGR4, <i>lytC::tet</i> ; TET ^R	Moscoso <i>et al.</i> , 2005a
P037	TIGR4, <i>lytB::ermC</i> ; ERY ^R	Moscoso <i>et al.</i> , 2005a
P038	TIGR4, <i>lytB::aphIII</i> ; KAN ^R	Moscoso <i>et al.</i> , 2005a
P044	TIGR4, <i>lytA::cat</i> ; <i>lytC::tet</i> ; CHL ^R , TET ^R	Moscoso <i>et al.</i> , 2005a
P077	TIGR4, <i>lytA::cat</i> ; <i>lytB::aphIII</i> ; CHL ^R , KAN ^R	Esta tesis
P078	TIGR4, <i>lytB::aphIII</i> ; <i>lytC::tet</i> ; KAN ^R , TET ^R	Esta tesis
P079	TIGR4, <i>lytA::cat</i> ; <i>lytB::aphIII</i> , <i>lytC::tet</i> ; CHL ^R , KAN ^R , TET ^R	Esta tesis
P092	D39 <i>lytA::cat</i> CHL ^R	Esta tesis
P093	D39 <i>lytC::tet</i> ; TET ^R	Esta tesis
P095	D39 <i>lytA::aphIII</i> ; KAN ^R	Esta tesis
P096	D39 <i>lytB::aphIII</i> ; KAN ^R	Esta tesis
P097	D39 <i>ply</i> ; ERY ^R	Esta tesis
P101	D39 <i>lytB::aphIII</i> ; <i>lytC::tet</i> ; KAN ^R , TET ^R	Esta tesis
P129	D39 <i>lytA::cat</i> ; <i>ply</i> ; CHL ^R , ERY ^R	Esta tesis
P130	D39, <i>lytA::aphIII</i> , <i>ply</i> ; KAN ^R , ERY ^R	Esta tesis
D39_IU ^c	S2 ⁺	Lanie <i>et al.</i> , 2007
P135	D39_IU <i>lytA::aphIII</i> KAN ^R	Esta tesis
P137	D39_IU <i>lytB::aphIII</i> ; KAN ^R	Esta tesis
P138	D39_IU <i>lytC::tet</i> ; TET ^R	Esta tesis
P139	D39_IU <i>lytA::aphIII</i> ; <i>lytC::tet</i> ; KAN ^R , TET ^R	Esta tesis
P140	D39_IU <i>ply</i> ; ERY ^R	Esta tesis
P141	D39_IU <i>lytA::aphIII</i> , <i>ply</i> ; KAN ^R , ERY ^R	Esta tesis
P148	D39 <i>lytA::cat</i> ; <i>pspC::aad9</i> ; CHL ^R ; SPT ^R	Esta tesis

MATERIALES Y MÉTODOS

P165	D39 <i>lytA::aphIII</i> transformada con pMV158GFP; KAN ^R , TET ^R	Esta tesis
P166	D39 <i>ply</i> transformada con pMV158GFP; ERY ^R , TET ^R	Esta tesis
P167	D39 transformada con pMV158GFP; TET ^R	Esta tesis
P168	D39 <i>lytA::cat; ply</i> transformada con pMV158GFP; CHL ^R , ERY ^R , TET ^R	Esta tesis
P169	D39_IU <i>lytC::tet; lytB::aphIII</i> ; TET ^R , KAN ^R	Esta tesis
P170	D39 <i>lytA::cat lytB::aphIII, lytC::tet</i> ; KAN ^R , TET ^R , CHL ^R	Esta tesis
P183	Cepa 69, <i>lytA</i>	Esta tesis
P185	Cepa 1515, <i>lytA</i>	Esta tesis
P188	D39, <i>pspC::aad9</i> ; SPT ^R	Esta tesis
S3	S23F ⁺ , ST81 (4,4,2,4,4,1,1), LytA ⁻ , VanT	Sung <i>et al.</i> , 2006
S3(<i>lytA</i> ⁺)	Transformante de la cepa S3 con pUCSpc- <i>lytA</i> ⁺ ; LytA ⁺ , VanNT, Spc ^R	Moscoso <i>et al.</i> , 2010
48	S23F ⁺	Soriano <i>et al.</i> , 2008
69	S19F ⁺	Soriano <i>et al.</i> , 2008
1515/97	S6B ⁺	Yuste <i>et al.</i> , 2002a

^a CHL, cloranfenicol; GFP, proteína con fluorescencia verde; KAN, kanamicina; SPT, espectinomicina; VanNT, no tolerante a vancomicina; VanT, tolerante a vancomicina.

^b Cepa NCTC 07466.

^c Cepa IU 1680 (Lilly).

Tabla 3. Plásmidos

Nombre	Descripción ^a	Referencia
pMV158GFP	Derivado de pMV158; TET ^R ; porta el gen que codifica GFP bajo el control de un promotor inducible por lactosa	Nieto y Espinosa (2003)
pGL100	Plásmido recombinante derivado de pIN-III(<i>pp</i> ^P -5)-A3 que sobreproduce LytA; AMP ^R	García <i>et al.</i> (1987)
pLCC14	Plásmido recombinante derivado de pT7-7 que sobreproduce LytC; AMP ^R	García <i>et al.</i> (1999b)
pRGR5	Plásmido recombinante derivado de pT7-7 que sobreproduce LytB; AMP ^R	De las Rivas <i>et al.</i> (2002)

^a AMP, ampicilina.

Tabla 4. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'→3'	Localización
LA 5' ext	^a ggctagAAGCTTTTTAGTCTGGGGTG	1723225–1723207 (R6/c)
LA 3' ext	^a gggatccAAGCTTTTTCAAGACCTAATAATATG	1722013–1722037 (R6)
LytB-N0	ACCAATCCTTATGCCTGCCC	858816–858835 (R6)
LytB-C2	GGCTTTGTCACTTACACAGG	861277–861258 (R6/c)
LytC-Hin	GAAGCTGAAGCTTCTTGGCTTTGC	1416095–1416071 (R6/c)
LytC-HinR	CTACTATATAAGCTTCATTTCCGAGC	1414399–1414424 (R6)
Ply-1	TTACAAGACCAACCTTGATTG	
Ply-2	CCTTTGGCTCGAGCAATCGCTTTATCG	

^a En minúscula, nucleótidos introducidos para crear sitios de restricción artificiales.

^b Los números entre paréntesis indican las posiciones de nucleótidos en la secuencia de la cepa R6 de neumococo (Número de acceso AE007317); /c significa que la secuencia corresponde a la cadena complementaria a la incluida en la base de datos.

1.2. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *S. pneumoniae* se multiplicaron en medio Todd-Hewitt (Oxoid, Inglaterra) conteniendo extracto de levadura al 0.5% (THY) o en placas de agar de soja tripticaseína o Agar D (dextrosa, 1 g l⁻¹; NaCl, 5 g l⁻¹; neopeptona, 5 g l⁻¹; Tris base, 1.25 g l⁻¹; extracto de levadura 1.25 g l⁻¹; casitona, 10 g l⁻¹) suplementado con 5% de sangre desfibrinada de carnero (Oxoid). Ocasionalmente, se utilizó el medio C ajustado a pH 8.0 (CpH8) (Lacks y Hotchkiss, 1960) suplementado (C+Y) o no con extracto de levadura (Difco) (0.08%). Las cepas se conservaron congeladas a -80°C en los diferentes medios de cultivo empleados, a los que se añadió glicerol al 10% (v/v) (concentración final). A menos que se indique lo contrario, en el momento de sembrarlos, los cultivos bacterianos se descongelaron e incubaron en los medios correspondientes a 37°C sin agitación. Las concentraciones de antibióticos utilizadas fueron: TET, 0.5 µg ml⁻¹; CHL, 4.5 µg ml⁻¹; ERY, 0.2 µg ml⁻¹; KAN, 250 µg ml⁻¹ y SPT, 100 µg ml⁻¹.

1.3. Reactivos y productos

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por las casas comerciales Difco, Oxoid, Pronadisa, Sigma-Aldrich, Merck y Becton Dickinson. La

agarosa fue suministrada por Pronadisa. La solución de 40% acrilamida:bisacrilamida (77.5:1; 2.6%) se adquirió a los Laboratorios Bio-Rad. La catalasa fue suministrada por la casa Boehringer Mannheim y la proteinasa K por Roche. Se emplearon la seroalbúmina bovina (BSA) que se preparó al 4% en agua a pH 7.5, RNasa, DNasa, AMP, TET, KAN, estreptomicina (STR), CHL, ERY, CRO, LVX, AMX y SPT, todos de Sigma-Aldrich. CDN, AZM y MDM fueron suministrados por Tedec-Meiji Farma S.A. Madrid, Farma Sierra y Menarini, respectivamente.

El péptido estimulante de la competencia, CSP1, de 17 aminoácidos (EMRLS-KFFRDFILQRKK) (Håvarstein *et al.*, 1995) fue sintetizado por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC).

Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 5.

1.4. Estudios de susceptibilidad antibiótica

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas clínicas 48, 69 y 1515/97 (Tabla 2) se llevó a cabo por la técnica de dilución en agar (Fenoll *et al.*, 1991), de acuerdo con los criterios del Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico (CLSI). Los estudios de susceptibilidad antibiótica fueron repetidos un mínimo de tres veces para cada cepa.

1.5. Obtención de suero humano, suero de ratón y suero hiperinmune

Las muestras de suero humano fueron obtenidas de sangre procedente de varones voluntarios sanos (edad media en torno a los 40 años), no vacunados frente a *S. pneumoniae* y de acuerdo con las directrices institucionales. En cuanto a los sueros de ratón, la sangre se extrajo mediante punción cardíaca de grupos de 4–5 ratones C57/BL6 (4–8 semanas) de acuerdo con el Real Decreto 1201/05 del 10 de octubre del 2005. Una vez obtenida, la sangre se mantuvo durante 2 h a 4°C para, después, centrifugarla a $5000 \times g$ durante 10 min con el fin de separar el suero. En determinados experimentos se utilizaron sueros humanos comerciales deficientes en los componentes C1q, factor B o C9 suministrados por Calbiochem.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados y otros reactivos

Compuesto	Descripción ^a	Excitación/ Emisión (nm)	Origen
Anticuerpo secundario A	Anti-ratón IgG conjugado con Rojo Texas (cabra)	589/615	AbD Serotec
Anticuerpo secundario B	Anti-rata IgG conjugado con TRITC (cabra)	557/576	Southern Biotech
Anticuerpo secundario C	Anti-cabra IgG conjugado con Dylight 649 (burro)	646/674	AbD Serotec
Anticuerpo secundario D	Anti-IgG oveja/cabra conjugado a FITC (burro)	495/519	AbD Serotec
Anticuerpo secundario E	Anti-IgG humana control negativo (rata)		AbD Serotec
Anticuerpo secundario F	Anti-IgG conejo conjugado a FITC (cabra)	495/519	AbD Serotec
Anticuerpo secundario G	Anti-IgG conejo conjugado a peroxidasa		Amersham
Anticuerpo secundario H	Anti-IgG conejo conjugado a TRITC (cabra)	557/576	AbD Serotec
BEAR1	Anti-CD11b humano (conejo)		Cedido por C. Bernabéu
C1q	Anti-C1q ratón (conejo)		Abcam
C1q-FITC	Anti-C1q humano conjugado con FITC (conejo)	495/519	AbD Serotec
C3b	Anti-C3b humano 34+35		Cedido por S. Rodríguez de Córdoba
C3b	Anti-C3b humano (cabra)		Calbiochem
C3b-FITC	Anti-C3b ratón conjugado con FITC (cabra)	495/519	Cappel (MP Biomedicals)
C3b-FITC	Anti-C3b humano conjugado con FITC (cabra)	495/519	Cappel (MP Biomedicals)
C4BP	Anti-C4BP humano (oveja)		AbD Serotec
CRP	Anti-CRP humana (conejo)		Calbiochem
EEA-1	Anti-EEA-1 ratón (conejo)		NBL
Hoechst 33342	Colorante fluorescente de ADN	350/461	AnaSpec
Rodamina/Faloidina	Colorante de actina-F	554/573	Invitrogen
KPL-1	Anti-PSGL-1 humano (ratón)		NBL
LAMP1	Anti-LAMP1 ratón (rata)		Southern Biotech
LAMP2	Anti-LAMP2 ratón (rata)		Southern Biotech
MARCO	Anti-MARCO ratón (rata)		AbD Serotec
SAP	Anti-SAP ratón (conejo)		Genescript

^a El origen de los anticuerpos se indica en paréntesis. FITC, isotiocianato de fluoresceína; TRITC, isotiocianato de tetrametil rodamina.

Los sueros hiperinmunes de ratón fueron obtenidos basándose en un protocolo descrito previamente (Casal *et al.*, 2002; Cafini *et al.*, 2010). Brevemente, la bacteria en fase de crecimiento exponencial fue inactivada mediante tratamiento por calor (1 h, 60°C), confirmándose la ausencia de bacterias vivas mediante la siembra de un pequeño volumen en placas de agar-sangre. A continuación, se inocularon grupos de 20 ratones, una vez a la semana durante más de cinco semanas por vía intraperitoneal (ip) con 200 µl de una suspensión bacteriana inactivada que contenía, en origen, 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC) ml⁻¹ de la cepa correspondiente. Los animales fueron desangrados por punción cardíaca para obtener el suero y éstos se almacenaron, como muestras de un solo uso, a -70°C para usarlos como fuente de complemento.

Los niveles de anticuerpos IgG específicos frente a los cepas de serotipos capsulares 6B, 19F y 23F (Tabla 1) fueron determinados tanto en suero preinmune como en suero inmune mediante el kit *NAb™ Protein A plus Spin* (Pierce®, Rockford,

EE.UU.) y un ensayo colorimétrico de proteínas (Bradford, 1976), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES ISOGÉNICOS

2.1. Transformación genética

Para transformar *S. pneumoniae* se prepararon células competentes según una metodología previamente descrita aunque con ligeras modificaciones. Se partió de un cultivo exponencial en medio CAT suplementado con glucosa 20%, KH_2PO_4 0.5 M y glutamina 30 mg ml^{-1} (Martin *et al.*, 1995). Este cultivo se diluyó 20 veces en un volumen final de 10 ml de medio completo 1 de transformación (CTM 1: medio CAT suplementado con 1 mM CaCl_2 y BSA al 0.2%) —que es el mismo medio utilizado anteriormente suplementado con $150 \mu\text{l}$ de BSA 4% y $30 \mu\text{l}$ de CaCl_2 0.1 M— y se incubó hasta alcanzar una densidad óptica a 550 nm (DO_{550}) de 0.18–0.2. Con el fin de detener el crecimiento bacteriano, el cultivo se puso en hielo, se centrifugó a $5000 \times g$ utilizando un rotor SS-34 durante 10 min a 4°C y las células se concentraron 10 veces en medio THY. Posteriormente, se añadió glicerol a una concentración final del 15% y las células se congelaron rápidamente en una mezcla de hielo seco-etanol conservándolas a -80°C . Para la transformación de *S. pneumoniae* inducida por CSP1, las células competentes (0.1 ml) se incubaron con 0.9 ml de medio CTM-2 (medio similar al CTM 1 excepto que el pH se ajustó a 7.9), en presencia de 100–250 ng ml^{-1} de CSP1 durante 12 min a 37°C . A continuación, se añadió el DNA donador a un mínimo de $100 \mu\text{l}$ de células activadas y la mezcla se incubó durante 20 min a 30°C . Se sembraron diluciones apropiadas de la transformación en placas de agar D suplementado con 3% de sangre desfibrinada de carnero y se incubaron durante 2 h a 37°C , para permitir la expresión fenotípica (Moscoso y Claverys, 2004). A continuación, los transformantes se seleccionaron añadiendo una segunda capa de agar D con el antibiótico adecuado y las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C . Algunas veces, la expresión fenotípica se llevó a cabo en medio líquido C+Y+A (medio C+Y suplementado con 0.08% de BSA) incubando la mezcla de transformación durante 90 min a 37°C y las diluciones correspondientes se sembraron en superficie en placas de agar-sangre con antibiótico o en placas de C+Y+A conteniendo catalasa.

3. TÉCNICAS DE DNA

3.1. Preparación de DNA cromosómico

El DNA cromosómico de *S. pneumoniae* se preparó utilizando un procedimiento descrito previamente (Fenoll *et al.*, 1994). Para ello, las células de un cultivo en C+Y ($DO_{550} = 0.6-0.7$) (10 ml) se sedimentaron por centrifugación a $10000 \times g$, utilizando un rotor SS-34 durante 5 min a 4°C. Los cultivos de mutantes *lytA* de neumococo se resuspendieron en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6.9 (SP) y 25 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Posteriormente, se añadió NAM-amidasa LytA pura (5–10 μg) y se incubó a 37°C durante 15–20 min. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 50 μl de una solución de desoxicolato sódico (Doc) al 10% en agua y se incubó a 37°C hasta la lisis total del cultivo. En el caso de los cultivos LytA⁺, el sedimento del cultivo se resuspendió en 0.4 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 mM EDTA, 0.4% Sarkosyl y 0.1% Triton X-100) (Morrison *et al.*, 1978), y se incubó a 37°C hasta la lisis del cultivo. A los cultivos lisados se les añadió RNasa (100 mg ml^{-1}) y se incubaron durante 1 h a 37°C y, posteriormente, proteinasa K (100–200 $\mu\text{g ml}^{-1}$) continuándose la incubación durante 1 h a 37°C. Las proteínas restantes se eliminaron mediante un tratamiento con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a $12000 \times g$ durante 5 min. Para precipitar el DNA, se pasó la fase acuosa a un tubo limpio y se añadieron 0.1 volúmenes de 3 M acetato potásico, pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo durante 20 min a -20°C y se sedimentó por centrifugación a $12000 \times g$ durante 20 min a 4°C. Para eliminar las sales que podrían haber coprecipitado con el DNA, se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 4°C, 10 min. El DNA sedimentado se dejó secar al aire para la eliminación completa del etanol de la muestra y se resuspendió en tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA).

3.2. Preparaciones de DNA plasmídico

Para la extracción de plásmidos a partir de *E. coli*, se inoculó la cepa correspondiente en 10 ml de medio LB (con el antibiótico requerido) y se incubó a 37°C en agitación durante 12–16 h hasta que alcanzó una DO_{600} de 1.5–5. Posteriormente, se procedió a la purificación del plásmido con el sistema comercial *High Pure Plas-*

mid Isolation Kit (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. En ocasiones, el plásmido fue purificado mediante centrifugación isopícnica en gradientes de CsCl-bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989).

Para la extracción de DNA plasmídico a partir de neumococo, se siguió un protocolo descrito previamente (Birnboim y Doly, 1979) con modificaciones para un cultivo de neumococo. La principal modificación consiste en el uso de Doc (concentración final, 1%) para producir la lisis celular del cultivo bacteriano. Para la extracción de plásmidos de cepas LytA⁻ se usaron 1400 unidades (U) ml⁻¹ de acromopeptidasa (Sigma-Aldrich).

3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa al 0.7 o 1.5% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8.1), utilizando el mismo tampón para el desarrollo de la electroforesis. A las muestras se les añadió 1/4 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0.2% (p/v), xilencianol al 0.2% y EDTA 40 mM (pH 8.0). La electroforesis se llevó a cabo a 100–150 V durante 60–90 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg ml⁻¹) o GelRed (Biotium) y los fragmentos de DNA se visualizaron con radiación ultravioleta. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron, según los casos, el DNA del fago λ digerido con BstEII (Amersham) y la forma replicativa del DNA del fago φX174 digerida con HaeIII así como los marcadores de 1 kb y de 100 pb en escalera de New England Biolabs.

3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de DNA se empleó un equipo *Mastercycler gradient* de Eppendorf y la enzima Taq polimerasa (Biotools) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Los productos amplificados se purificaron utilizando *GeneClean Turbo Kit* (MP Biomedicals) o, en el caso de un solo producto amplificado, el *High Pure™ PCR Product Purification Kit* (Roche).

4. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS

4.1. Expresión y purificación de enzimas líticas

Para la purificación de las CBPs capaces de degradar las paredes celulares de neumococo, se siguió el protocolo descrito previamente para la NAM-amidasa LytA García *et al.*, 1987), con algunas modificaciones. Brevemente, un cultivo de *E. coli* RB791 (pGL100) se inoculó en medio LB suplementado con AMP ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) y 2% de lactosa y se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche. Posteriormente, el cultivo se dejó en hielo durante 15 min y las células se recogieron por sedimentación a $10000 \times g$ durante 10 min a 4°C , se lavaron con tampón SP (tampón fosfato sódico 20 mM; pH 6.9) y se resuspendieron en 10 ml del mismo tampón. La lisis celular se realizó pasando la suspensión por una prensa de French a una presión de 8.3 MPa y se descartaron los restos celulares con una centrifugación a $15000 \times g$ durante 10 min a 4°C . Los extractos celulares se mantuvieron en hielo y se pasaron por una columna de dietilaminoetil- (DEAE)-celulosa previamente equilibrada con tampón SP. La columna se lavó con el mismo tampón suplementado con 1 M NaCl para eluir las proteínas que no tienen afinidad por DEAE. La proteína LytA se eluyó con el mismo tampón conteniendo 1 M NaCl y 2% de cloruro de colina. Posteriormente, se comprobó la actividad de la enzima y se verificó la pureza de la misma mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (12%). En el caso de la purificación de la lisozima LytC se siguió el protocolo descrito por García *et al.* (1999b). Para ello, la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) con el plásmido pLCC14 se incubó en medio LB suplementado con AMP ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) en agitación a 37°C hasta alcanzar una $\text{DO}_{600} = 0.5$. En este punto, se realizó la inducción de la expresión del gen *lytC* mediante la adición de $40 \mu\text{M}$ de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y el cultivo se incubó durante 3 h a 22°C para disminuir, en lo posible, la presencia de cuerpos de inclusión. El cultivo se centrifugó a $10000 \times g$ durante 5 min a 4°C y las células se resuspendieron en tampón SP (pH 6.0). La lisis celular se realizó pasando la suspensión por una prensa de French a una presión de 8.3 MPa y se descartaron los restos celulares con una centrifugación a $15000 \times g$ durante 15 min a 4°C . Los extractos celulares se mantuvieron en hielo y se pasaron por una columna de dietilaminoetil celulosa previamente equilibrada con tampón SP (pH 6.0). A partir de aquí, se siguió el protocolo descrito ante-

riormente para la NAM-amidasa LytA aunque utilizando una concentración de cloruro de colina del 2% en el tampón de elución.

La proteína LytB se purificó siguiendo un protocolo similar, salvo que la inducción del cultivo de *E. coli* BL21(DE3) (pRGR5) se realizó con 50 μ M de IPTG cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria ($DO_{600} = 0.8$) y se continuó la incubación durante 6 h a 25°C (De las Rivas *et al.*, 2002).

4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

Las electroforesis analíticas de proteínas se realizaron en todos los casos en condiciones desnaturizantes en presencia de SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), utilizando geles de poliacrilamida en placa (100 \times 75 \times 1 mm) a una concentración de 10, 12.5 o 15%, según los experimentos. Las muestras se hirvieron durante 5 min en presencia del tampón de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8; SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0.005%). Las electroforesis se realizaron a temperatura ambiente y a 50 mA (corriente constante), utilizando un tampón que contenía Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0.1%. Las proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie R-250 (Swank y Munkres, 1971). Las proteínas empleadas como marcadores de masa molecular se adquirieron de Bio-Rad: miosina (200 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa b (97.4 kDa), BSA (66.2 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa) e inhibidor de tripsina (21.5 kDa). Para el análisis de péptidos y proteínas de bajo peso molecular se utilizó la técnica de Schägger y von Jagow (1987) que utiliza tricina [Tris(hidroximetil)metil]glicina] en lugar de glicina.

4.3. Transferencia a membranas, incubación con anticuerpos y detección

Las proteínas previamente sometidas a SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa *Trans-Blot[®] Transfer Medium* (BioRad) utilizando el sistema *Trans-Blot[®] SD Semy dry transfer cell*. Para cada gel, se utilizó una membrana de nitrocelulosa y 6 piezas de papel Whatmann del mismo tamaño que el gel. La membrana, así como los papeles Whatmann, se equilibraron en tampón de transferencia frío (Tris base, glicina y metanol). Estos componentes se colocaron en el sistema de transferencia a modo de sándwich. Los papeles Whatmann se situaron a ambos lados de la membrana, y en el interior quedaron en contacto el gel y la membrana de

nitrocelulosa. La transferencia se realizó mediante electroforesis durante 15 min a 15 V. A continuación, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó cubriéndolas con leche descremada al 5% en PBS (10 mM Na₂HPO₄·2 H₂O, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 6.8) durante toda la noche a 4°C y en agitación constante (20 × g). En un paso previo a la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron tres lavados de la membrana con solución de bloqueo PBS-Tween-20 0.05% durante 10 min y en agitación (20 × g) a temperatura ambiente.

Para los estudios de la degradación del C3b, la membrana se incubó durante toda la noche con un anticuerpo primario —anti-C3b humano (conejo) (cedido por el Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba; CIB-CSIC)— diluido 1/2500 en PBS-Tween 0.1% a 4°C y en agitación. Se realizaron 3 lavados y las membranas se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario —IgG anti-conejo conjugado a peroxidasa HRP (Amershan)— diluido 1/2000 en PBS-Tween-20 0.1% que se retiró tras 3 lavados realizados siguiendo el procedimiento ya descrito.

Para la detección se utilizó el sistema comercial ECL (Amershan Biosciences) que utiliza una reacción de bioluminiscencia. Las soluciones 1 y 2 se mezclaron a partes iguales, cubriendo cada membrana con 5 ml de la mezcla durante 1 min tras el cual se eliminó la solución sobrenadante en papel Whatmann. La membrana se envolvió en film transparente y se colocó en el casete de detección y, sobre ellos, una película fotográfica (Hyperfilm-ECL Amershan Biosciences).

5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN CON EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

5.1. Depósito del complemento: C3b, C1q, CRP, SAP, C4BP y fH

Los experimentos de depósito de las distintas moléculas del complemento sobre la superficie de *S. pneumoniae* se realizaron utilizando un ensayo de citometría de flujo (Brown *et al.*, 2002). Las muestras de suero, como ya se ha mencionado, fueron obtenidas de donadores sanos de mediana edad. Además, se utilizaron sueros humanos comerciales deficientes en los componentes C1q y factor B de la vía clásica y alternativa, respectivamente, utilizando sueros deficientes en C9 como suero control. Los viales de bacteria congelados a -80°C, se descongelaron y centrifugaron a 13000 × g durante 8 min para, posteriormente, resuspenderlos en PBS (pH 6.8). El proceso de opsonización consistió en mezclar 10 µl de una suspensión bacteriana en PBS conteniendo 5 × 10⁶ UFC con 10 µl de suero humano, diluido al 50% en

PBS y las muestras se incubaron durante 20 min a 30°C o 37°C, dependiendo del tipo de experimento. Para eliminar el complemento no unido se realizaron dos lavados utilizando 200 µl de PBS-Tween-20 (0.1%). Para detectar el depósito de la molécula objeto de estudio en la superficie bacteriana, se añadieron 50 µl de anticuerpo primario conjugado con FITC o bien de anticuerpo primario sin conjugar en función de su disponibilidad comercial. La dilución de los anticuerpos utilizados fue de 1/300. El tiempo de incubación fue de 30 min en hielo y oscuridad para el depósito de C3b-FITC, de 2 h en oscuridad a 37°C para C1q-FITC y de 1 h y en hielo para el resto de anticuerpos primarios. Después de la incubación con el anticuerpo, se lavó la bacteria dos veces con 200 µl de PBS-Tween-20 (0.1%) como en los pasos anteriores con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo no unido y, finalmente, se añadieron 50 µl de paraformaldehído (PFA) al 3% (Merck) a temperatura ambiente para fijar la bacteria. En los casos en que el anticuerpo primario no estaba conjugado con ningún fluorocromo, se añadieron 50 µl de anticuerpo secundario y se incubó durante 30 min en hielo y oscuridad. Como en los pasos anteriores, se realizaron dos lavados con 200 µl de PBS-Tween-20 (0.1%) con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo no unido y, finalmente, se añadieron 50 µl de PFA al 3%. Se completó el volumen de todas las muestras hasta 250 µl con PBS para su posterior análisis mediante citometría de flujo utilizando los citómetros FACS Calibur (BD Bioscience) y FC 500 (Beckman Coulter) ajustando la concentración bacteriana en función de los parámetros tamaño y complejidad y adquiriendo, al menos, 25000 bacterias para su estudio (Yuste *et al.*, 2005). Los ensayos se repitieron al menos tres veces y los resultados se expresaron como proporción de molécula depositada en la superficie de los distintos mutantes comparada con el depósito sobre la cepa silvestre. También se expresaron los resultados como índice relativo de fluorescencia (IRF) en el que se analizó la proporción de bacteria positiva para la molécula estudiada y la intensidad de fluorescencia que permite determinar cuántas moléculas se unen por bacteria (Exley *et al.*, 2005). El IRF es definido como la proporción de células positivas para neumococo multiplicado por la media geométrica de la intensidad de fluorescencia. Las bacterias incubadas en PBS en lugar de suero y sueros inactivados por calor (56°C durante 30 min) fueron incluidas como controles negativos (Yuste *et al.*, 2010).

Para analizar si la adición exógena de proteína LytA, LytB o LytC a los respectivos mutantes *lytA*, *lytB* y *lytC*, podría tener algún efecto sobre el depósito de C3b en la superficie de la bacteria, se realizó el mismo protocolo descrito anteriormente

añadiendo la correspondiente proteína purificada antes del proceso de opsonización. Las cantidades utilizadas fueron de 2 μg para LytB y LytC. En los estudios de la degradación de C3b por la proteína LytA, se usaron concentraciones de 0.01 y 0.3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de LytA, y 0.01 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tanto de C-LytA como de la proteína mutante LytAH133.

5.2. Efecto de los anticuerpos en la inmunidad frente a *S. pneumoniae* mediado por la presencia de antibióticos

Los aislados clínicos usados en los estudios con antibióticos fueron los siguientes: cepa 1515/97 [S6B⁺; PEN CMI = 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$; CDN CMI = 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$; CRO CMI = 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$]; cepa 69 (S19F⁺; PEN CMI = 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$; CDN CMI = 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$; CRO CMI = 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y cepa 48 (S23F⁺; PEN CMI = 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$; CDN CMI = 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$; CRO CMI = 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Se determinó el depósito de C3b, C1q y de las proteínas de fase aguda CRP y SAP mediante el mismo ensayo de citometría descrito anteriormente con ligeras modificaciones. Las diferentes estirpes se incubaron en presencia de suero de ratón diluido al 50% durante 2 h, en presencia o ausencia de 0.5 CMI y 0.25 CMI de los antibióticos del estudio y, posteriormente, tras dos lavados con 200 μl de PBS-Tween-20 (0.1%), las bacterias fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes en función de lo que se quisiera determinar: policlonal de ratón anti-C3b humano conjugado con FITC (ICN-Cappel), policlonal de oveja anti-C1q humano conjugado con FITC (AbD Serotec), policlonal de conejo anti-CRP humana (Calbiochem), policlonal de conejo anti-SAP humana (GenScript) y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con FITC (AbD Serotec). El resto de la metodología incluyendo lavados para eliminar el exceso de anticuerpo no unido así como los tiempos de incubación con los diferentes anticuerpos está detallado en el apartado 5.1. En los ensayos de C3b, además, el suero preinmune de ratón y el hiperinmune se trataron con MgCl_2 (2 mM)-EGTA (2 mM) para inhibir la actividad de la vía clásica y de la vía de las lectinas, de modo que la única vía de activación del complemento pudiera tener lugar a través de la vía alternativa (Des Prez *et al.*, 1975). Una vez fijadas las muestras con PFA al 3%, las bacterias fueron analizadas en un citómetro FACS Calibur (BD Biosciences).

6. OPSONOFAGOCITOSIS DE *S. PNEUMONIAE*

6.1. Marcaje de *S. pneumoniae* con FAM-SE

Con el fin de realizar estudios de opsonofagocitosis, se marcaron las bacterias con el fluorocromo 5,6-carboxifluoresceína, succidinimil éster (FAM-SE) (Romero-Steiner *et al.*, 1997). En primer lugar, las cepas se incubaron en medio THY a 37°C hasta una DO₅₅₀ de 0.6-0.7. A continuación, las bacterias se lavaron con tampón de bicarbonato sódico (0.1 M, pH 8.0), se añadieron 50 µl de FAM-SE (10 mg ml⁻¹ en dimetilsulfóxido) en tampón de bicarbonato sódico durante 1 h a 37°C y, posteriormente, se lavaron seis veces con HBSS comercial (tampón salino de Hank) que contiene calcio y magnesio. Los viales se conservaron a -70°C en medio THY al que se le añadió 15% de glicerol para su posterior utilización en los estudios de opsonofagocitosis.

6.2. Fagocitosis mediada por macrófagos alveolares

El análisis de la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares se llevó a cabo siguiendo un protocolo descrito previamente (Martí-Lliteras *et al.*, 2009). Las monocapas de células MH-S (CRL-2019; ATCC) se incubaron en medio de cultivo RPMI 1640 con glutamina (GIBCO, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Sigma-Aldrich) inactivado por calor durante 30 min a 56°C y 10 mM HEPES (GIBCO). El día anterior a realizar el experimento, las células se crecieron durante toda la noche a 37°C y 5% CO₂ en placas de 24 pocillos (Falcon, BD) con una densidad de 7×10^5 células por pocillo. Al día siguiente, las células se infectaron por triplicado con 50 µl de una suspensión de neumococos —en una proporción de 50 bacterias por célula— y se incubaron a 37°C.

Para los ensayos de adhesión, las células fueron infectadas durante 30 min. Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS y, seguidamente, se lisaron con 300 µl de una solución de saponina 0.025% (Sigma) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. La proporción de bacteria viable recuperada de las células infectadas se determinó mediante diluciones seriadas en placas de agar-sangre.

En el caso de los ensayos de fagocitosis, las células previamente infectadas con las diferentes cepas durante 30 min, se lavaron del mismo modo (tres veces con PBS) y se incubaron durante 1 o 4 h en medio de cultivo al que se le habían añadi-

do $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de PEN, y $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ de gentamicina con el fin de matar las bacterias extracelulares. La proporción de bacteria internalizada se obtuvo igualmente lavando las células tres veces con PBS y procediendo a la lisis de las mismas, como se ha explicado anteriormente.

Los experimentos fueron repetidos un mínimo de tres veces y los resultados fueron expresados como UFC de neumococo recuperado por ml del lisado recogido de las células MH-S que habían sido infectadas con los diferentes mutantes, en comparación a las células infectadas con la cepa silvestre, D39 o TIGR4, utilizadas como control.

6.3. Fagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares

A diferencia de la fagocitosis mediada por macrófagos, la mediada por neutrófilos se analizó mediante un ensayo de citometría de flujo, utilizando las cepas de *S. pneumoniae* marcadas con FAM-SE (Molecular Probes) y la línea celular HL-60 (CCL-240; ATCC) diferenciada a granulocitos (Martínez *et al.*, 1999) aunque, en algunos casos, se utilizaron neutrófilos aislados de ratón (Eggleton *et al.*, 1989). El estado de diferenciación de las células fue confirmado antes de los ensayos usando un anticuerpo monoclonal anti-CD11b (cedido por el Prof. Carmelo Bernabéu, CIB-CSIC), que es un marcador de la diferenciación granulocítica (Fleck *et al.*, 2005). Las células diferenciadas se lavaron dos veces con HBSS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} pero suplementado con 0.2% de BSA) y un lavado adicional con HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} suplementado igualmente con 0.2% de BSA. Para realizar el recuento de células viables se utilizó un hematocitómetro y, mediante tinción con azul tripán (Sigma-Aldrich), se visualizó la proporción de células viables realizándose el experimento sólo cuando la viabilidad celular era superior al 95%. Las células se mantuvieron a $0-4^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

Los experimentos de fagocitosis se realizaron utilizando placas multipocillo (Nunc). En primer lugar, se incubaron 10^6 UFC de bacterias marcadas con FAM-SE en $10 \mu\text{l}$ de suero humano diluido 1/20 durante 20 min a 37°C y con agitación ($150 \times g$). A continuación, se añadieron 10^5 células HL-60 diferenciadas incubándose durante 30 min a 37°C en agitación. Finalmente, se añadieron $50 \mu\text{l}$ de PFA al 3% para fijar las células e inactivar las bacterias y se completó el volumen con $100 \mu\text{l}$ de HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} para su posterior análisis mediante citometría de flujo. Las muestras se transfirieron a tubos de citómetro y se guardaron en oscuridad hasta su

análisis. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces y, como controles negativos, se utilizaron bacterias incubadas en PBS y suero inactivado por calor. Los resultados se expresaron como índice de fluorescencia, que se define como la proporción de células positivas que contienen bacteria fluorescente multiplicada por la media geométrica de la intensidad de fluorescencia (Yuste *et al.*, 2010).

Para confirmar que el efecto observado en los diferentes mutantes era debido a la carencia de la proteína, se realizaron experimentos de fagocitosis en presencia o ausencia de 2 μ g de proteína purificada (LytB y/o LytC).

6.4. Efecto de antibióticos β -lactámicos en la fagocitosis de *S. pneumoniae* mediada por neutrófilos

Para explorar el efecto de la combinación de concentraciones subinhibitorias de antibióticos y de anticuerpos específicos en la interacción de *S. pneumoniae* con células fagocitarias, se midió el nivel de fagocitosis usando el protocolo de citometría descrito en el apartado anterior (Yuste *et al.*, 2007, 2008). El ensayo se llevó a cabo utilizando la línea celular HL-60 y, además, se analizó también con neutrófilos aislados de sangre periférica de ratón, siguiendo protocolos descritos anteriormente (Eggleton *et al.*, 1989). Brevemente, la técnica se basa en la lisis de los hematíes con una solución de cloruro de amonio isotónica seguida de una centrifugación diferencial para separar los polimorfonucleares o PMNs.

Las cepas de *S. pneumoniae* se marcaron con una solución de FAM-SE y 10^6 UFC fueron opsonizadas con suero hiperinmune diluido 1/10 en presencia o ausencia de concentraciones subinhibitorias 0.5 CMI o 0.25 CMI de CDN (cepa 48, 69 y 1515/97) o CRO (cepa 69) durante 1 h a 37°C y en agitación a $150 \times g$. A la bacteria así opsonizada se añadieron 10^5 células fagocíticas en una placa multipocillo y se incubaron durante 30 min a 37°C con agitación para, posteriormente, fijar las células y las bacterias con PFA al 3% y analizar las muestras mediante citometría de flujo. Se analizaron un mínimo de 6000 células por muestra y los resultados fueron expresados como IRF definido como la proporción de células positivas para neumococo multiplicada por la media geométrica de la intensidad de fluorescencia. Se realizaron experimentos de control con la cepa 69 de *S. pneumoniae* para confirmar que la bacteria fluorescente no se veía afectada por el proceso de opsonización con suero o por la presencia de antibióticos.

6.5. Microscopía láser confocal

La microscopía láser confocal (CLSM) fue utilizada en esta tesis para observar la fagocitosis de neumococo mediada por el receptor de neutrófilos PSGL-1. También se utilizó para determinar compartimentos intracelulares de fagocitosis del doble mutante *lytA ply* analizando endosomas tempranos y endosomas tardíos. Para ello, las células se infectaron con bacteria opsonizada expresando la GFP utilizando la metodología descrita anteriormente, aunque en presencia de 2% de maltosa. En el caso de la fagocitosis mediada por neutrófilos, tras una hora de incubación en la que transcurre la fagocitosis, se realizaron dos lavados de 6 min a $1000 \times g$, uno en presencia de HBSS sin Ca^{+2} y Mg^{+2} y, otro, en presencia de HBSS con ambos cationes. Como las células HL-60 crecen en suspensión no adhiriéndose a las placas de cultivo celular, se centrifugaron en un *cytospin* 3 (Thermo Scientific) durante 10 min a $1100 \times g$ para conseguir que las células se pudieran adherir en cristales de 13 mm de diámetro (VWR international) (Huang *et al.*, 2010). Las células se fijaron con 3% de PFA durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con HBSS con Ca^{+2} y Mg^{+2} conteniendo 2% de maltosa y se resuspendieron en 1 ml de una solución 1 M de NH_4Cl en PBS. El receptor PSGL-1 se marcó utilizando una dilución 1/300 del anticuerpo primario de ratón anti-PSGL-1 humano (KPL1) a temperatura ambiente durante 30 min y, posteriormente, con un anticuerpo secundario anti-ratón (Rojo Texas) durante 30 min a temperatura ambiente. La dilución de éste último fue de 1/200. El DNA se marcó con Hoechst 33342 diluido 1/2500. El citoesqueleto celular se marcó utilizando un conjugado de rodamina-faloidina (diluido 1/200) que se une a actina F.

En la fagocitosis mediada por macrófagos se analizó el tráfico intracelular de la bacteria una vez que era fagocitada. Tras la fagocitosis, las células se fijaron con 300 μ l de PFA al 3% durante 10 min a temperatura ambiente y, tras dos lavados en PBS, se resuspendieron en 1 ml de una solución 1 M de NH_4Cl en PBS. La tinción de las vesículas fagocíticas se determinó añadiendo el correspondiente anticuerpo primario, diluido 1/50 en el caso del marcador EEA-1 o 1/200 en el caso de LAMP-1 y LAMP-2, en una solución de 40 μ l de PBS-saponina conteniendo 10% de suero de caballo y Hoechst 33342 diluido 1/2500. Los endosomas tempranos fueron marcados con anti-EEA-1 ratón (de conejo) (NBL). Los endosomas tardíos se marcaron con los anticuerpos anti-ratón LAMP1 y LAMP2 (de rata) (Biotech) y el DNA se tiñó con Hoechst 33342 (Invitrogen). Transcurridos 30 min de incubación a temperatura

ambiente y en oscuridad, las células se lavaron dos veces en 0.025% de PBS-saponina, una vez con PBS pH 7.0 y se incubaron finalmente con los correspondientes anticuerpos secundarios en 40 μ l de una solución de PBS-saponina conteniendo 10% de suero de caballo. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: H (para EEA-1) y B (para LAMP-1 y LAMP-2), diluidos 1/200 (Tabla 5). Las células fagocíticas se observaron utilizando un microscopio Leica (TCS SP5 AOBS) y el objetivo Plan APO 63 \times 1.4. Las imágenes se analizaron mediante el *software* de Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF). Se obtuvieron las proyecciones de los planos xyz.

7. UNIÓN DE NEUMOCOCO A CÉLULAS NASOFARÍNGEAS

Para investigar la implicación de las diferentes CBPs en la colonización de la nasofaringe se realizaron estudios de adhesión utilizando la línea celular epitelial de nasofaringe humana Detroit 562 (D562) (CCL138; ATCC). Las monocapas de células D562 se crecieron en frascos de cultivos o bien en placas de cultivo, hasta alcanzar el 90–95% de confluencia, utilizando medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 1% de glutamina y 1 mM de piruvato sódico (Hendriksen *et al.*, 2008). La noche antes de realizar el experimento, las células se crecieron en placas de 24 pocillos (Falcon) con una densidad de 10^5 células por pocillo. El día del experimento, las células se infectaron por triplicado con los aislados bacterianos en una proporción de 10 bacterias por célula y se incubaron a 30°C o 37°C durante 1 h, en una atmósfera que contenía 5% de CO₂. Por último, los pocillos infectados se lavaron con PBS (pH 7.3) y se trataron con 200 μ l por pocillo de una solución conteniendo 0.25% tripsina, 1 mM EDTA y 200 μ l de una solución 0.025% Tritón X-100 en PBS, utilizando idéntica metodología a la descrita anteriormente por otros autores (Hendriksen *et al.*, 2008).

Para calcular la proporción de bacterias recuperadas de las células infectadas, se llevó a cabo el correspondiente recuento de viables. Los experimentos se repitieron tres veces y los resultados se expresaron como la proporción de bacterias recuperadas de las células D562 con los diferentes mutantes en comparación con los grupos control de células infectadas con la cepa silvestre.

8. MODELOS ANIMALES

Todos los procedimientos científicos con animales de experimentación se realizaron según el Real Decreto 1201/05 del 10 de octubre del 2005. Los animales fueron criados en el animalario del CIB (CSIC), excepto los ratones deficientes en PSGL-1, que fueron cedidos por el grupo de investigación liderado por el Prof. Francisco Sánchez-Madrid y la Dra. Ana Urzainqui (Hospital de la Princesa, Madrid), así como los ratones utilizados en los experimentos con antibióticos, que fueron adquiridos en Harlan Laboratories Models, Barcelona. Los experimentos de infección se realizaron en el animalario de la Fundación Jiménez-Díaz así como en el del Centro Nacional de Microbiología (Majadahonda, Madrid). Los Comités pertinentes de ambas instituciones aprobaron todos los experimentos realizados con animales en este estudio (CIB-FJD 06010017). Hay que destacar que, en los experimentos llevados a cabo en modelos animales para analizar el papel de LytB y LytC en patogenicidad, se utilizó siempre la cepa silvestre D39_IU [(también llamada IU1680 o D39 (Lilly) (Lanie *et al.*, 2007)] y sus mutantes correspondientes (Tabla 2). Sin embargo, en los experimentos en los que se analizó el papel de LytA y Ply, se utilizó la cepa D39 (NCTC 7466). Por razones no totalmente comprendidas, estas cepas poseen una capacidad infectiva ligeramente diferente (Lanie *et al.*, 2007).

8.1. Modelo de colonización en ratón

En primer lugar se estudió la capacidad de las cepas virulentas silvestres para inducir una colonización prolongada en los ratones. Para ello, se inocularon grupos de 5 animales, machos o hembras indistintamente, de la estirpe C57BL/6 (8–16 semanas), bajo anestesia con isofluorano, por vía intranasal (in) con 10 μl de una suspensión bacteriana conteniendo 10^9 UFC ml^{-1} de las cepas D39 o TIGR4 de *S. pneumoniae*. Los animales se sacrificaron, con una dosis letal de pentobarbital, diariamente durante un período de 7 días y los recuentos bacterianos se obtuvieron de los lavados nasofaríngeos realizados con 500 μl de PBS estéril utilizando un catéter pediátrico de 20 GA.

Para comparar la capacidad colonizadora de las cepas silvestres frente a la obtenida con los diferentes mutantes sencillos o múltiples, se inocularon grupos de, al menos, 5 ratones anestesiados con 10 μl de una suspensión conteniendo 10^7 UFC de cada una de las cepas en grupos separados (McAllister *et al.*, 2004; Quin *et al.*,

2007b). A las 24 h y 120 h se administró una dosis letal de pentobarbital para poder obtener el lavado nasofaríngeo. Se realizaron diluciones seriadas de las distintas muestras de lavado obtenidas y se sembraron en placas de agar-sangre para determinar las bacterias viables. Los experimentos se repitieron al menos tres veces. Los resultados fueron expresados como \log_{10} UFC ml^{-1} .

8.2. Modelos de sepsis y neumonía para determinar el grado de atenuación en virulencia de los diferentes mutantes en CBPs

Para investigar el papel de las diferentes CBPs en el establecimiento de la infección, se utilizaron grupos de 5 ratones (machos o hembras, indistintamente), bien CD-1 o C57/BL6 de 4–8 semanas de edad. Se determinó el grado de atenuación en virulencia de los mutantes mediante experimentos de infecciones mixtas en una proporción 1:1 para calcular el índice de competitividad (IC), definido como la proporción de la cepa a analizar (mutante sencillo o doble) en relación a la cepa control infectiva (cepa silvestre o mutante sencillo respectivamente) recuperados del ratón, dividido entre la proporción de la cepa de estudio y la cepa control presentes en el inóculo (Fig. 8) (Beuzón y Holden, 2001; Yuste *et al.*, 2005). Un valor de IC = 1 indica que el mutante no está atenuado en comparación con la cepa control mientras que un valor de IC <1 indica que la cepa de estudio tiene atenuada su capacidad para producir infección en comparación con la cepa control. Cuanto menor de 1 sea este valor de IC, mayor será el grado de atenuación en virulencia de la cepa en cuestión y, por consiguiente, mayor será la implicación de la proteína correspondiente en la virulencia del microorganismo.

8.2.1. Modelo de sepsis neumocócica

Los viales de bacteria fueron descongelados y lavados en PBS. Los ratones fueron inoculados por vía ip con un total de 5.6×10^6 UFC/ml (en una suspensión de infección de 200 μl conteniendo 5.6×10^4 UFC de cada cepa en una mezcla de infección en proporción 1:1). A las 24 h post-infección, se administró una dosis letal de pentobarbital (Euthal) obteniendo la sangre mediante punción cardíaca y el bazo de los animales para determinar el nivel de infección. El IC fue calculado mediante recuento de colonias recuperadas a las 24 h tras sembrar diferentes diluciones seriadas en placas de agar sangre con y sin antibiótico, ya que para distinguir el nivel de bacte-

ria en sangre de la cepa estudio y de la cepa control nos basamos en la resistencia antibiótica de los mutantes construidos.

8.2.2. Modelo de neumonía neumocócica

Para el modelo de neumonía, las cepas se inocularon por vía in bajo anestesia con un total de 2×10^7 UFC (en un volumen de $50 \mu\text{l}$ conteniendo 10^7 UFC de cada cepa). A las 24 h post-infección, se recuperaron las bacterias de la sangre de la arteria femoral de los ratones. Además, se obtuvieron las bacterias de los pulmones y del líquido obtenido mediante lavado broncoalveolar (BALF) con la ayuda de un catéter con el que se realizaron lavados con 1 ml de PBS. Los recuentos bacterianos se determinaron mediante diluciones seriadas y siembra en placas de agar-sangre con y sin antibiótico.

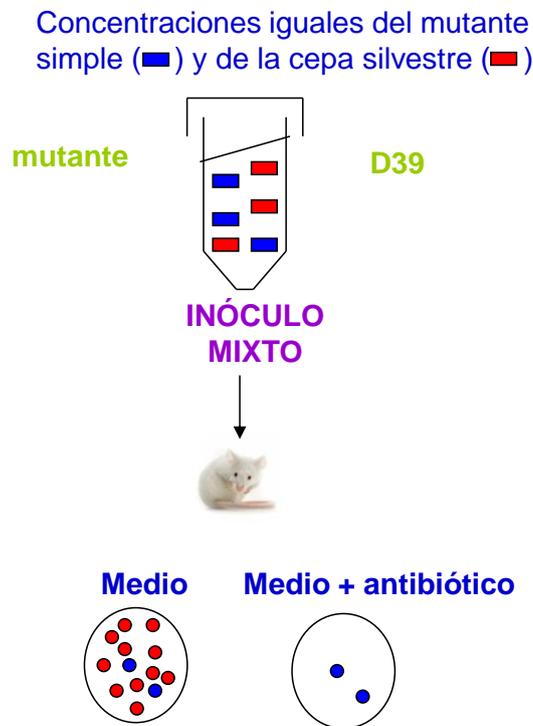


Fig. 8. Esquema para la determinación de los índices de competitividad. Modificado de Beuzón y Holden (2001).

8.3. Determinación de la dosis letal mínima

Se inocularon grupos de 5 ratones BALB/C de 8–12 semanas por vía ip con diferentes diluciones bacterianas en medio THY para calcular la dosis letal mínima que producía el 100% de mortalidad en un período de 7 días.

8.4. Protección por suero hiperinmune o antibióticos

Se inocularon grupos de 5 ratones BALB/C de 8–12 semanas por vía ip con 200 μ l de diluciones seriadas de suero hiperinmune (desde 1/2 hasta 1/8). Los animales pertenecientes al grupo control se inocularon con un placebo (PBS). Una hora más tarde, los animales recibieron una dosis letal de bacteria por vía ip. Los animales fueron examinados a los 7 días. La mayor dilución que mostraba un 100% de mortalidad, se consideró como dilución no protectora de suero hiperinmune.

Para estudiar la protección por antibióticos, grupos de 5 ratones BALB/C de 8–12 semanas de edad, fueron infectados por vía ip con una dosis letal de bacteria. Una hora después, los animales fueron tratados cada 8 h durante 2 días administrando 100 μ l por vía subcutánea en un rango de dosis comprendido entre 6.25 mg kg⁻¹ y 100 mg kg⁻¹ de peso corporal. Los animales incluidos en el grupo control fueron tratados con PBS. Los animales fueron observados varias veces al día y el número de muertos se registró diariamente a lo largo de los 7 días de seguimiento. La mayor dosis que producía la supervivencia más baja fue considerada como dosis no protectora.

8.5. Modelo de sepsis para determinar la protección mediada por antibióticos β -lactámicos en presencia de anticuerpos específicos

Grupos de 10 ratones hembras BALB/C (8–12 semanas de edad) con un peso de 19–22 g, recibieron una dosis única de suero hiperinmune por vía ip administrada 1 h antes de la inoculación, también por vía ip, de la dosis letal mínima de la bacteria. El tratamiento antibiótico con dosis no protectoras se inició 1 h después de la infección neumocócica y fue continuada cada 8 h. Se administró una total de seis dosis subcutáneas. Los animales fueron observados y el número de muertes fue registrado a lo largo de 7 días. En cada experimento de protección se usaron 3 grupos con-

trol: uno que recibió placebo, otro suero hiperinmune no protector y, un tercero que fue tratado únicamente con una dosis no protectora de antibiótico.

8.6. Recuentos bacterianos en suero en los estudios de protección

Con el fin de conocer el comportamiento *in vivo* de la bacteria inoculada por vía ip y analizar la posible eliminación de la bacteria en sangre, se determinó el perfil bacteriémico de la cepa infectante de neumococo. Los perfiles bacteriémicos fueron determinados en grupos de 10 ratones BALB/C que recibieron el tratamiento combinado de una dosis de suero hiperinmune no protectora más una dosis de antibióticos no protectora, así como en aquellos grupos control que recibieron suero, antibiótico o bacteria de forma independiente. Se eligieron 5 animales de cada grupo al azar y se extrajeron muestras de sangre a las 2, 4, 6, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h post-infección (solamente de animales vivos). Para recoger las muestras de sangre, se desinfectaron las colas de los ratones y se aplicó anestesia local (cloruro de etilo; ERN, Barcelona). Se cortó la parte terminal de la cola utilizando unas tijeras estériles. Se recogieron 8 μ l de sangre mediante presión en la cola y se resuspendieron en 50 U de heparina (Calbiochem, Darmstadt, Alemania). La sangre recuperada se sembró en placas de agar sangre para el recuento de colonias. Para obtener el resto de muestras de sangre, se retiró la costra cicatricial y, de nuevo, presionando la cola del animal anestesiado, se recogieron otros 8 μ l. Este procedimiento asegura el muestreo de sangre sin comprometer la supervivencia. El límite de detección más bajo fue de 10^2 UFC ml^{-1}

8.7. Determinación de concentraciones de antibiótico en suero

La concentración de antibiótico que se alcanzaba en el suero de ratón a diferentes tiempos tras inocular el antibiótico se determinó mediante la técnica de bioensayo (Andrews, 1999; González *et al.*, 2009). Las concentraciones séricas de los antibióticos fueron determinadas en ratones sanos después de la administración de una única dosis subcutánea de todas las dosis de antibióticos utilizadas en los estudios de rango de antibióticos. Se recogieron muestras de sangre por punción cardíaca a 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, y 8 h y los sueros se congelaron a -80°C para su posterior análisis. El proceso de obtención de suero se explicó en el apartado 1.5. de Materiales y Métodos. Para determinar la concentración de antibiótico en el suero, se utilizaron

placas del agar correspondiente (9 ml) conteniendo una sobrecapa (4 ml) de los microorganismos *M. morgani* ATCC 8076H o *E. coli* ATCC 25922, para CDN y CRO respectivamente. Los microorganismos se incubaron en el medio líquido y, una vez alcanzada la concentración adecuada (medida por turbidimetría), se diluyó 100 veces añadiendo los 4 ml a la capa de agar basal ya solidificada. A continuación, se realizaron orificios en el agar y se añadieron 8 μ l de la muestra, tanto de suero como de antibiótico. Las placas se incubaron durante 18–24 h. Puesto que no se conocía la concentración de antibiótico en el suero problema a los diferentes tiempos fue necesario hacer diluciones medias partiendo del suero puro hasta 1/1024 y sembrar en cada orificio una alícuota de esas diluciones. La curva patrón se estableció con concentraciones conocidas del antibiótico representando en el eje de abscisas la concentración del antibiótico (en μ g ml⁻¹) y, en el de ordenadas, el diámetro del halo de inhibición. Para conocer la concentración de antibiótico se interpolaron en esta curva los diámetros de los halos obtenidos con la muestra de suero. Esta determinación se repitió en todas las muestras de suero obtenidas.

9. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Esta parte de la Tesis fue realizada en el laboratorio del Dr. Lorenzo Aguilar del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la UCM, de acuerdo a una colaboración establecida entre ambos grupos para desarrollar los estudios con antibióticos y anticuerpos específicos. La unión de proteína al suero de ratón se midió por un método de ultracentrifugación (Craig *et al.*, 1991) para concentraciones de CDN y CRO de 4 y 64 mg ml⁻¹, respectivamente, usando un dispositivo de centrifugación (CentrifreeH, Amicon Bioseparations, Millipore, Tullagreen, Irlanda). Las concentraciones de antibióticos en muestras prefiltradas de suero de ratón y en los ultrafiltrados recuperados fueron analizadas mediante bioensayo. Los porcentajes de antibióticos unidos a proteínas de suero de ratón fueron calculados mediante la expresión: [antibiótico en suero]-[antibiótico en ultrafiltrados] / [antibiótico en suero] \times 100. Los valores de proteína unida fueron determinados experimentalmente en suero de ratón y utilizados para calcular la concentración libre de cada antibiótico. Las curvas de antibiótico concentración-tiempo para cada uno de ellos se analizaron mediante un acercamiento no compartimental utilizando el programa Win-Nonlin (Pharsight, Mountain View, California). La concentración teórica a tiempo cero (obtenida por extrapolación al origen de la línea de regresión de eliminación) y $t_{1/2}$ se

calculó por análisis de regresión no lineal. El área bajo las curvas de tiempo-concentración de suero (AUCs) desde el tiempo cero a infinito fue calculado utilizando la regla trapezoidal. $t > \text{CMI}$ y libre $t > \text{CMI}$ ($ft > \text{CMI}$), se calcularon gráficamente a partir de los puntos semilogarítmicos de los datos concentración-tiempo.

10. MICROSCOPIA ÓPTICA

La formación de cadenas bacterianas en presencia de antibióticos se estudió mediante microscopía óptica en contraste de fases. Brevemente, 20 μl de una suspensión bacteriana conteniendo 5×10^6 UFC de las diferentes cepas se incubó durante 2 h en PBS, suero hiperinmune, o en presencia de 0.5 CMI de cada antibiótico. Las muestras se analizaron utilizando un microscopio Leica con un objetivo de contraste de fases 100 \times (DM4000B). Las imágenes se obtuvieron usando una cámara Leica (DFC360-FX) y fueron analizadas con el software de Leica AF6000-DFC.

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos que se muestran a lo largo de esta Tesis son representativos de los resultados obtenidos de la repetición de experimentos independientes. Además, cada dato muestra la media y la desviación estándar (DS) de 3–5 réplicas. Para el análisis estadístico se empleó el test t de Student de dos colas mientras que, para las comparaciones múltiples, se usó un análisis de la varianza (ANOVA).

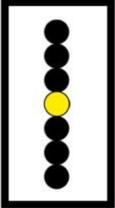
Los resultados de interacción con CRP, SAP, C1q y C3b en presencia de suero y concentraciones subinhibitorias de CDN y CRO fueron comparados con los obtenidos para los controles de suero en ausencia de antibiótico usando el test t de Student de dos colas (para dos grupos). Para las comparaciones múltiples se usó un análisis de la varianza (ANOVA) más un test post hoc Dunnett.

En los experimentos de aumento de la protección inducida por el sistema inmune en presencia de antibióticos, los datos presentados son las medias y las DS para tres experimentos independientes con, al menos, tres réplicas cada uno.

Los experimentos de supervivencia, en los que se determinaron el efecto protector analizando dosis no protectoras de antibióticos en presencia de anticuerpos en un modelo animal, se utilizó el test *log-rank ordinal* (Mantel–cox) para comparar el valor significativo de los animales supervivientes en los diferentes grupos experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad InStat version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).



IV. RESULTADOS

1. BASES MOLECULARES DE LA PATOGENESIS MEDIADA POR LAS PROTEÍNAS LYTB Y LYTC

La interacción de las hidrolasas de pared celular LytB y LytC con el hospedador así como el papel de estas proteínas en el establecimiento de la patogénesis de neumococo son aspectos importantes pero poco conocidos. En este primer objetivo de la Tesis se analizó el papel de tales proteínas en la persistencia de *S. pneumoniae* en el tracto respiratorio superior. Además, se investigó la posible implicación de las mismas en la evasión de la inmunidad mediada por el sistema del complemento y la fagocitosis, así como su participación en el establecimiento de la neumonía y el desarrollo de la sepsis.

1.1. Adhesión a células epiteliales de nasofaringe

Se analizó la adhesión de los mutantes *lytB* y *lytC* a células de nasofaringe humana utilizando la línea celular Detroit 562 (D562) así como dos cepas clínicas de neumococo de diferentes serotipos, TIGR4 (serotipo 4) y D39 (serotipo 2). Estos estudios se realizaron a dos temperaturas diferentes, esto es, a 37°C —la temperatura fisiológica del cuerpo humano— y a 30°C, que coincide con la temperatura del tracto respiratorio superior. En ausencia de ambas proteínas, se observó una disminución en la capacidad de neumococo para unirse a las células D562 a ambas temperaturas y en ambos serotipos (Fig. 9). La adhesión del mutante D39 *lytC* resultó ser menor que la del mutante D39 *lytB* cuando se incubó a 30°C, que es la temperatura óptima para LytC. Para investigar si ambas proteínas cooperan en la unión a las células de la nasofaringe, se evaluó el comportamiento de los dobles mutantes. Independientemente del serotipo ensayado, las tasas de adhesión de los mutantes *lytB lytC* en ambos serotipos fueron mucho menores tanto a 30°C como a 37°C en comparación con la cepa parental y con los mutantes sencillos, siendo este efecto aún más marcado a 30°C (Fig. 9).

1.2. Evasión del sistema del complemento

Para estudiar la interacción de LytB y LytC con el sistema del complemento se construyeron mutantes isogénicos, simples en LytB (cepa P096; Tabla 2) y LytC

(cepa P093) y el doble *lytB lytC* (estirpe P101), y se midió el depósito de C3b en la superficie bacteriana mediante citometría de flujo (Fig. 10). La unión de C3b al mutante *lytB* fue similar a la observada en la cepa silvestre y ello tanto a 30°C (Fig. 10A, B) como a 37°C (Fig. 10C, D). Sin embargo, en comparación con la cepa silvestre, los niveles de C3b depositados fueron significativamente mayores en el mutante *lytC* a ambas temperaturas. Resulta destacable que la unión de C3b en el doble mutante *lytB lytC* fue mucho mayor a la encontrada tanto en la cepa silvestre como en los mutantes sencillos, indicando que la actividad de ambas proteínas tiene un efecto aditivo en la inhibición de la actividad del complemento. Además, cuando en el momento de la opsonización se añadieron las proteínas LytB y LytC a los correspondientes mutantes y se analizó el depósito de C3b en presencia o ausencia de dichas proteínas, se pudo observar una notable reversión del fenotipo característico de los correspondientes mutantes, en lo que a depósito de C3b se refiere (Fig. 10E).

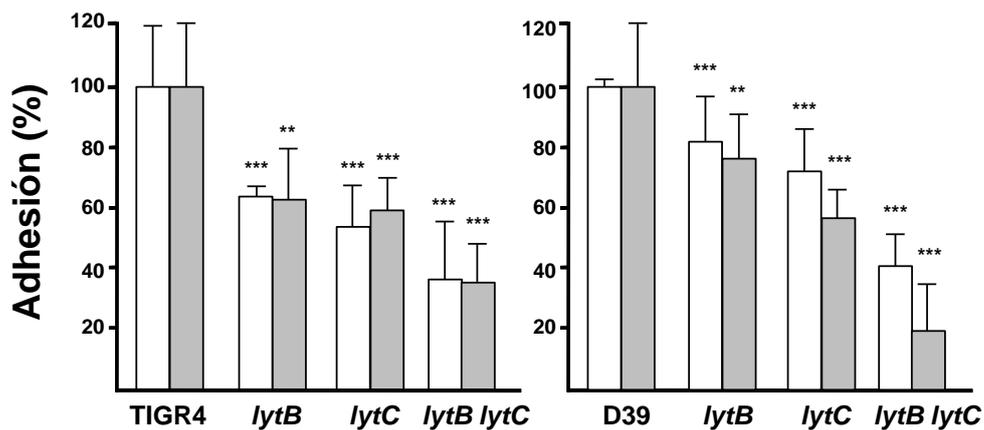


Fig. 9. Bacterias adheridas a células D562 infectadas con la cepa parental o con los diferentes mutantes. Las células D562 se incubaron a 37°C (barras blancas) y a 30°C (barras grises). Las barras de error representan la DS y los asteriscos representan los valores que son estadísticamente significativos en comparación con la cepa silvestre (Test *t* de Student de dos colas; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (Panel izquierdo) Cepa TIGR4 y mutantes isogénicos. $P < 0.01$ (*lytB* frente a *lytB lytC*) y $P = 0.09$ (*lytC* frente a *lytB lytC*) (Test *t* de Student de 2 colas). $P < 0.001$ para la comparación global (Test de ANOVA de una vía seguido de un Test de Dunnett). En el panel derecho, se muestran los resultados obtenidos con la cepa D39 y sus mutantes. Para el doble mutante *lytB lytC* frente a *lytB* o *lytC*: $P < 0.001$ (Test *t* de Student de 2 colas). $P < 0.001$ para la comparación global (test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett).

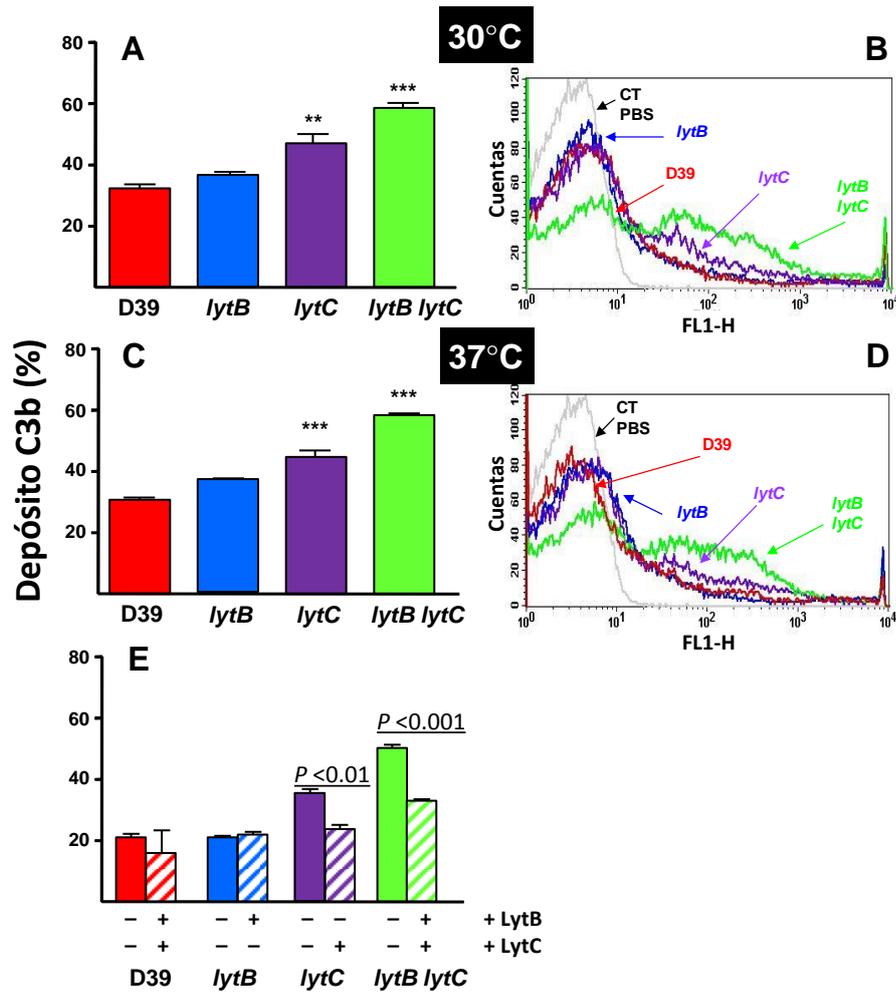


Fig. 10. Efecto de LytB y LytC en el depósito de C3b. (A y C) Depósito de C3b a 30°C y 37°C respectivamente. (B y D) Histogramas de citometría de flujo para el depósito de C3b. Las barras de error representan la desviación estándar (DS) y los asteriscos indican los valores que son estadísticamente significativos en comparación con la cepa silvestre (test *t* de Student de 2 colas; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). $P < 0.001$ (a 30°C y 37°C) para la comparación de los resultados del mutante *lytB lytC* frente a los mutantes simples. Para la comparación de los mutantes con la cepa silvestre D39 se utilizó un test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnet ($P < 0.001$). (E) Recuperación de los niveles de C3b en la superficie de los diferentes mutantes en presencia de 2 μ g de la correspondiente proteína purificada.

1.2.1. Evasión de la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares

Los macrófagos alveolares presentes en el pulmón son células centinela que constituyen la primera línea de defensa frente a las infecciones de modo que, la eliminación de *S. pneumoniae* del pulmón y la sangre depende, en gran medida, de la capacidad de estas células para reconocer y destruir al patógeno.

Se utilizó la línea celular murina MH-S para analizar la fagocitosis de los mutantes *lytB*, *lytC* y *lytB lytC*. La adhesión a los macrófagos alveolares fue ligeramente mayor en el mutante *lytB* que en la cepa silvestre, mientras que no se detectaron diferencias de adhesión en el mutante *lytC* (Fig. 11A). Sin embargo, la fagocitosis resultó ser más eficiente en el caso de los dos mutantes simples (Fig. 11B), lo que sugiere que, cada una de estas proteínas, reduce la fagocitosis por los macrófagos alveolares. Además, tanto la adhesión como la fagocitosis de las células del doble mutante *lytB lytC* fueron mucho mayores que las obtenidas con la cepa silvestre o los mutantes sencillos.

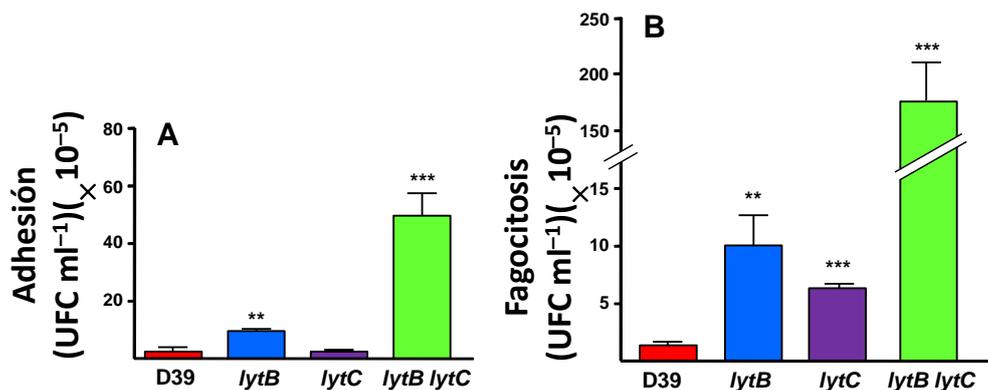


Fig. 11. Papel de LytB y LytC en la adhesión a y la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares murinos. (A) Adhesión de la cepa silvestre D39 y los diferentes mutantes. (B) Fagocitosis de la cepa silvestre D39 y los distintos mutantes por los macrófagos alveolares. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores que son estadísticamente significativos en relación a la cepa silvestre (Test *t* de Student de 2 colas; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). $P < 0.05$ y $P < 0.01$ para la comparación de resultados en adhesión y fagocitosis del mutante *lytB lytC* frente a los mutantes sencillos *lytB* o *lytC*, respectivamente. $P < 0.001$ para la comparación global en fagocitosis (test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett).

1.2.2. Evasión de la fagocitosis mediada por neutrófilos PMNs

Los experimentos de fagocitosis se realizaron también utilizando la línea celular humana HL-60. Para confirmar que las células HL-60 en presencia de dimetilformamida se habían diferenciado correctamente a granulocitos, se determinó la expresión de CD11b (receptor de iC3b y cadena α CR₃) (Fleck *et al.*, 2005) que es un marcador granulocítico de diferenciación que demuestra la presencia del receptor del componente C3 en las células utilizadas (Fig. 12).

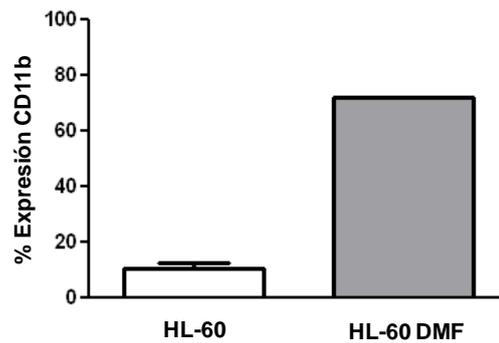


Fig. 12. Expresión del receptor CD11b en células HL-60 diferenciadas con 100 mM dimetilformamida, o no diferenciadas.

Como se muestra en la figura 13, la fagocitosis de los mutantes sencillos *lytB* y *lytC* fue significativamente mayor que la de la cepa silvestre, indicando que ambas proteínas participan en la evasión de la fagocitosis mediada por neutrófilos humanos. La fagocitosis del doble mutante *lytB lytC* resultó ser todavía mucho más elevada. Para estudiar si la combinación de LytB y LytC es más eficaz en la evasión de la fagocitosis de *S. pneumoniae* que cada proteína por separado, se repitieron los experimentos en presencia de las correspondientes proteínas purificadas, ya que ha sido descrito que las proteínas de unión a colina, cuando se añaden a un cultivo bacteriano, se unen rápida y específicamente a los residuos de colina localizados en la superficie neumocócica (De las Rivas *et al.*, 2002; López y García, 2004). Estos experimentos confirmaron que la mayor eficacia con la que se fagocitan las estirpes

mutantes era debida, principalmente, a la ausencia de las correspondientes proteínas y, además, confirmaron que la combinación de LytB y LytC tiene un efecto muy marcado en la evasión de la fagocitosis de *S. pneumoniae* (Fig. 13).

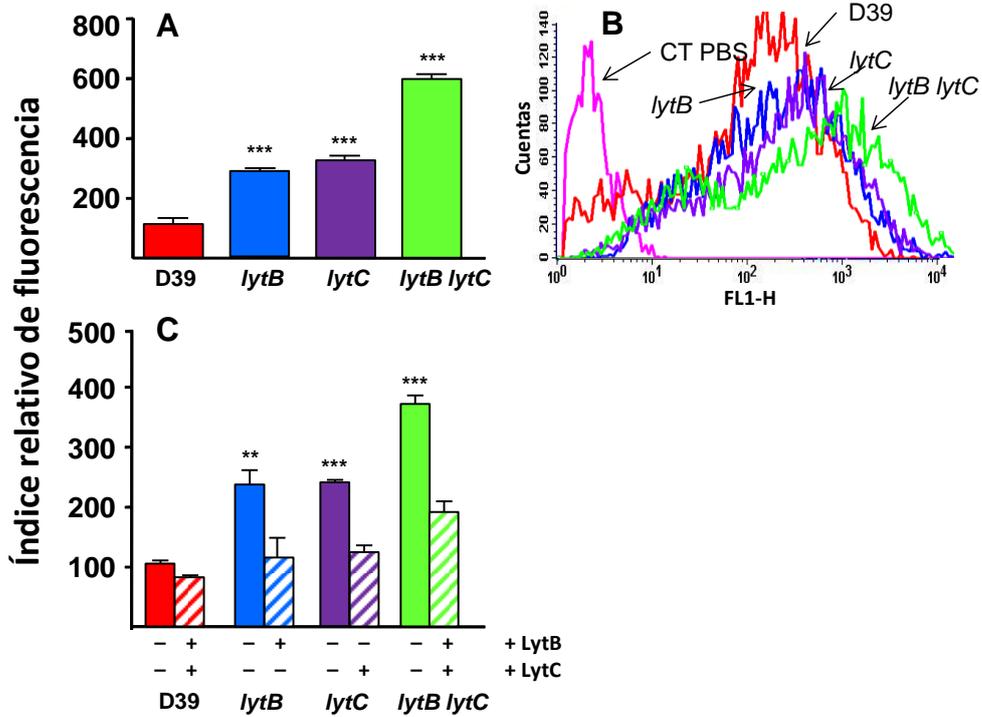


Fig. 13. Análisis, mediante citometría de flujo, de la opsonofagocitosis de neumococo mediada por neutrófilos humanos. (A y B) La cepa D39 y los diferentes mutantes fueron incubados en 20% de suero humano y los resultados se expresan como IRF con respecto a los valores obtenidos para la cepa silvestre. (C) Recuperación de los niveles de fagocitosis de los distintos mutantes en presencia de 2 μ g de la proteína indicada. Las barras lisas representan la fagocitosis sin la adición de proteínas y las rayadas, la fagocitosis en presencia de las mismas. Las barras de error representan la DS y los asteriscos representan los valores que son estadísticamente significativos en comparación con la cepa silvestre (Test *t* de Student de dos colas; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). $P < 0.001$ para la comparación global de la fagocitosis (test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett). Para la comparación de la fagocitosis de los diferentes mutantes en presencia o ausencia de las proteínas añadidas de forma exógena, $P < 0.05$ para *lytB* y $P < 0.01$ para *lytC* o *lytB lytC*.

1.3. Papel de *LytB* y *LytC* en la enfermedad neumocócica

1.3.1. Colonización

Con el fin de investigar el papel de estas dos proteínas en la colonización de la nasofaringe en condiciones *in vivo*, se puso a punto un modelo experimental murino de colonización nasofaríngea. La primera determinación que se realizó consistió en evaluar si una dosis elevada de bacteria era capaz de producir una colonización prolongada. Para ello, las cepas D39 y TIGR4 se inocularon por vía in y se determinó el número de bacterias presentes en la nasofaringe mediante recuento de viables a partir del lavado de la nasofaringe. Las tasas de colonización se mantuvieron relativamente constantes a lo largo de los 7 días de seguimiento, obteniendo niveles de bacteria que oscilaban entre 10^4 y 10^5 UFC ml^{-1} (Fig. 14A). Además, se recogieron muestras de sangre diariamente a lo largo de los 7 días del estudio sin detectar la presencia de bacterias en sangre, comprobándose así que los animales no desarrollaban bacteriemia (observaciones no publicadas).

Los mutantes sencillos *lytB* y *lytC* mostraron una capacidad reducida de colonización, con un efecto especialmente marcado para el mutante *lytC* a tiempos largos (Fig. 14B, C). Además, a las 24 h post inoculación, los doble mutantes mostraron una menor capacidad para colonizar la nasofaringe del ratón en comparación con los mutantes sencillos, sugiriendo que la combinación de ambas proteínas es muy efectiva en las fases iniciales de la colonización nasofaríngea y, por tanto, en el establecimiento del denominado estado de portador.

1.3.2. Contribución de *LytB* y *LytC* a los procesos de neumonía y sepsis neumocócicas

Como se ha mencionado previamente, *S. pneumoniae* es el principal agente etiológico de las neumonías adquiridas en la comunidad y una causa frecuente de sepsis bacteriana. Por ello, y utilizando modelos animales, se investigó si las proteínas *LytB*, *LytC* o ambas, podrían ser factores de virulencia implicados en la ENI.

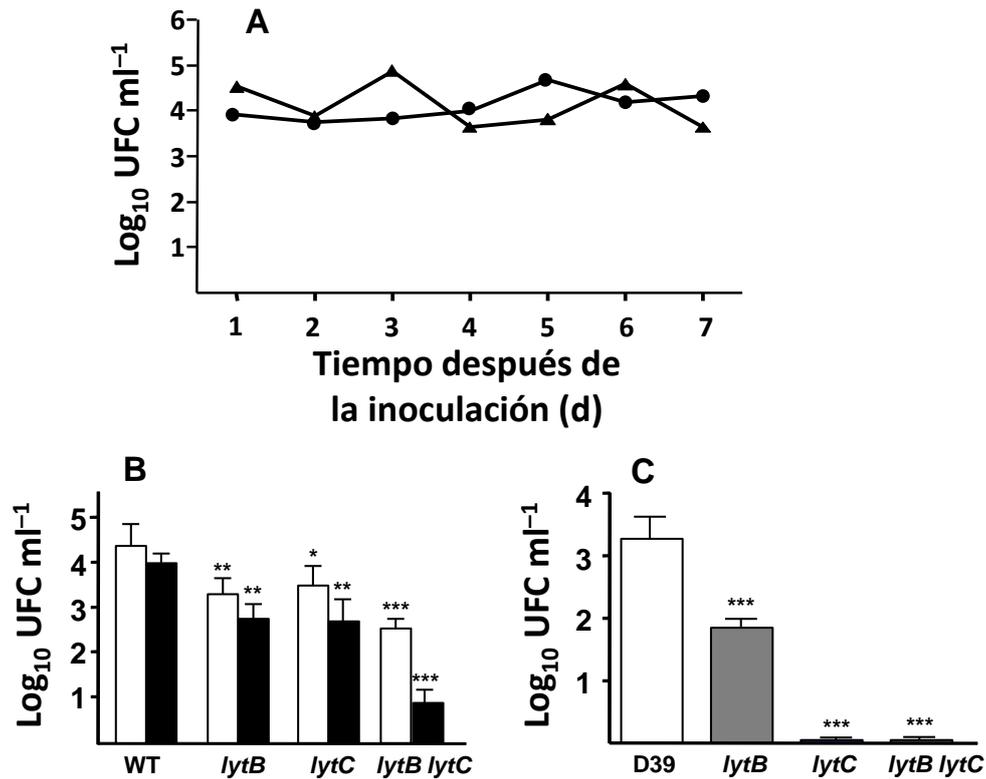


Fig. 14. Colonización nasofaríngea. (A) Proceso de colonización de ratones inoculados por vía in con dos cepas de *S. pneumoniae*, TIGR4 (triángulos) y D39_IU (círculos). (B) Colonización nasofaríngea a las 24 h post inoculación en ratones infectados con TIGR4 (barras blancas) o D39 (barras negras) y los correspondientes mutantes. Las barras de error representan la DS y, los asteriscos, los valores estadísticamente significativos (Test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Para el doble mutante frente a *lytB* o *lytC*, los valores son: $P < 0.01$ para TIGR4 y $P < 0.001$ para D39_IU. $P < 0.001$ para todas las comparaciones (test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett). (C) Colonización nasofaríngea en ratones infectados a los 5 días post inoculación con la cepa D39_IU.

Para investigar el grado de atenuación en virulencia de las mutaciones en *LytB* y *LytC*, se determinaron los índices de competitividad (IC) en un modelo experimental de sepsis murina. El IC para el mutante *lytB* (cepa P137; Tabla 2) fue próximo a 1, indicando que la proteína *LytB*, por sí sola, no desempeña un papel significativo

en el establecimiento de la sepsis neumocócica (Fig. 15A). En marcado contraste con el mutante *lytB*, el IC fue significativamente <1 para el mutante *lytC* (cepa P138) en comparación con la cepa parental y mucho menor para el doble mutante *lytB lytC* (cepa P169; Tabla 2) en comparación con los mutantes sencillos y la cepa silvestre indicando, que la pérdida de ambas hidrolasas, da lugar a una mayor atenuación en virulencia. Para detectar diferencias en la atenuación entre un mutante doble y uno sencillo, se siguió un protocolo descrito previamente que incluye la coinfección del mismo animal con el mutante doble y el mutante sencillo (Beuzón y Holden, 2001). En una infección mixta con la cepa portadora de mutaciones en dos genes y la cepa portadora de una sola, la atenuación causada por la mutación compartida debe ser equivalente y, por tanto, se anula. El IC obtenido después de la anulación del efecto de una de las mutaciones representa la contribución que la otra mutación aporta a la atenuación del doble mutante.

Para confirmar más aún que la pérdida de ambas proteínas, LytB y LytC, resultaba en una reducción sinérgica de la virulencia del microorganismo, se realizaron infecciones mixtas de las cepas D39 *lytB lytC* y D39 *lytC*. Dado que la mutación en LytC está presente en las dos cepas, el IC debería ser similar al correspondiente IC del mutante *lytB*. Sin embargo, si el IC fuera menor, los resultados indicarían la existencia de un fenotipo sinérgico o, al menos, aditivo de las dos mutaciones analizadas. Los resultados obtenidos (Fig. 15B) confirmaron la existencia de un IC significativamente menor que el encontrado para el mutante *lytB* frente a la cepa silvestre D39, demostrando que LytB y LytC cooperan de alguna manera en el establecimiento de la sepsis neumocócica.

A continuación, se analizó el papel en virulencia de LytB y LytC utilizando para ello un modelo murino de neumonía neumocócica. Para ello, se inocularon simultáneamente los diferentes mutantes junto con la cepa parental D39 por vía in (Fig. 16). La mutación *lytB* no mostró ningún grado de atenuación, lo que sugiere que LytB no participa de forma directa en el desarrollo de la neumonía neumocócica. En relación al mutante *lytC*, se observó que tenía una capacidad muy mermada para multiplicarse en el tracto respiratorio inferior, invadir tejido pulmonar y diseminarse a la sangre desde el pulmón. Además, se investigó el grado de atenuación en virulencia del doble mutante observando que, la pérdida de ambas proteínas, también ocasionaba una capacidad reducida para producir infección pulmonar y diseminación sistémica, sugiriendo que la presencia de las proteínas correspondientes es fundamental para la patogenicidad del microorganismo.

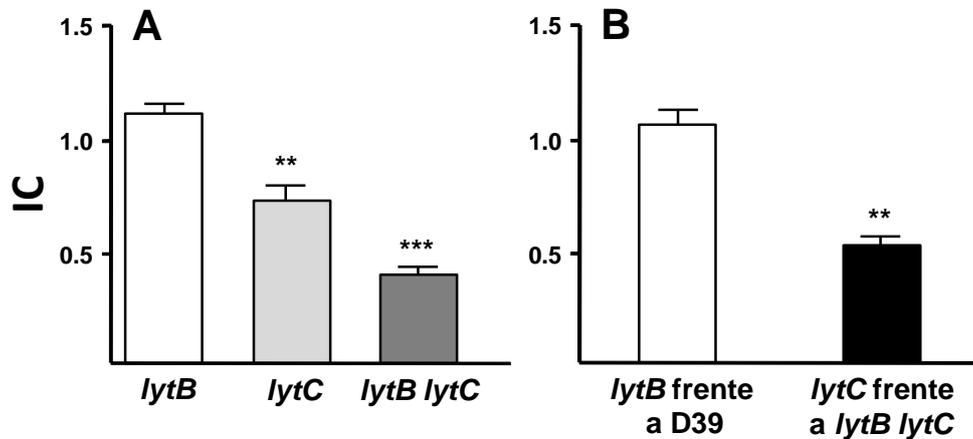


Fig. 15. Determinación de la virulencia de los mutantes en mureín-hidrolasas utilizando un modelo murino de sepsis. (A) Virulencia representada como índices de competitividad (IC) de las cepas *lytB*, *lytC* y *lytB lytC* en comparación con la cepa silvestre D39. Las barras de error representan la desviación estándar. Para las comparaciones de los resultados de los ICs de la cepa *lytC* frente a *lytB*: **, $P < 0.01$ (test *t* de Student de dos colas). Para la comparación del mutante *lytB lytC* frente a los mutantes *lytB* o *lytC*: ***, $P < 0.001$; *, $P < 0.05$, respectivamente. (B) IC para la cepa *lytB* en comparación con D39 e IC del mutante doble en comparación con la cepa D39 *lytC*. **, $P < 0.01$ para la combinación de ambos ICs.

Para dilucidar si la pérdida de LytB y LytC podría tener un efecto sinérgico en la neumonía neumocócica se utilizaron infecciones mixtas para comparar los ICs de la combinación del doble mutante *lytB lytC* y la cepa *lytC* con el obtenido para la infección mixta de *lytB* frente a la cepa silvestre. Los resultados obtenidos mostraron que el IC para la infección de *lytB lytC* frente a *lytC* fue entre dos y tres veces menor en el pulmón (1.13 frente a 0.39 en BALF y 1.06 con respecto a 0.34 en el pulmón; $P < 0.01$) y cerca de cinco veces en sangre (1.02 frente a 0.23; $P < 0.01$) que el IC para la infección de *lytB* frente a la cepa silvestre (Fig. 16D).

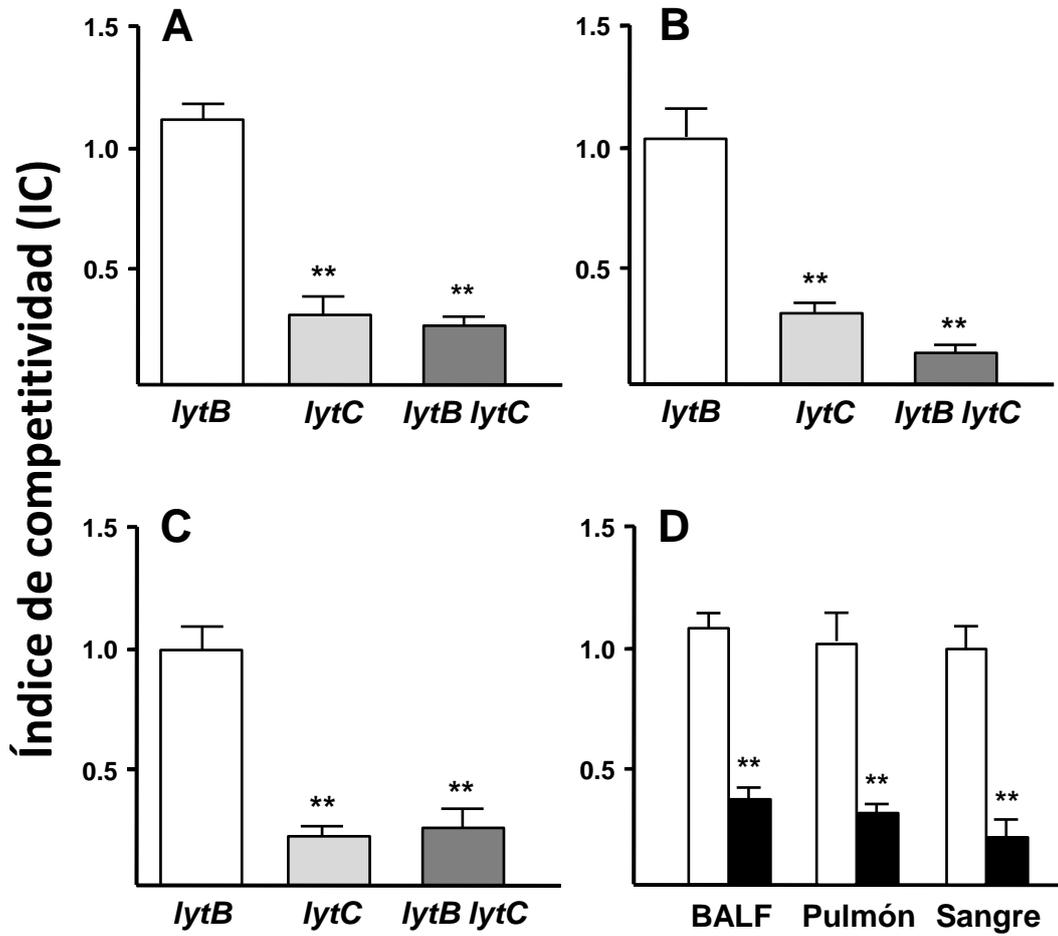


Fig. 16. Impacto de las mutaciones en LytB y LytC en la neumonía neumocócica. (A–C) ICs de los mutantes *lytB*, *lytC* y *lytB lytC* en comparación con la cepa D39 en BALF (A), pulmón (B), y sangre (C) tras infecciones de una combinación del correspondiente mutante con la cepa silvestre. Las barras de error representan las DS y los asteriscos indican los resultados estadísticamente significativos (Test *t* de Student de dos colas; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (D) ICs de *lytB* frente a D39 (barras blancas) y *lytB lytC* frente a *lytC* (barras negras) en BALF, pulmones y sangre. **, $P < 0.01$ para la comparación de ambas infecciones mixtas en los correspondientes sitios de infección.

2. PAPEL DE LA AUTOLISINA LYTA EN LA EVASIÓN DE LOS MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR

La neumolisina (Ply) es una de las proteínas que contribuye de un modo importante en el potencial patogénico de neumococo. Como ya se ha comentado detalladamente en esta Memoria (véase apartado 1.4.2.4 de Introducción), Ply parece ser de localización mayoritariamente citoplásmica aunque existen algunas evidencias experimentales apoyando que podría estar parcialmente expuesta al exterior celular. Una vez que Ply se libera al medio, es capaz de participar en los mecanismos que permiten a neumococo evadir la vía clásica del complemento; además, Ply posee actividad citotóxica al producir poros en la superficie de las células eucarióticas (Marriot *et al.*, 2008). En contraste con lo conocido sobre Ply, en el caso de la autolisina mayoritaria de neumococo LytA existe muy poca información sobre su papel en la virulencia de este microorganismo. Actualmente, está comúnmente aceptado que LytA podría participar en virulencia mediante dos mecanismos diferentes. El primero sería por su efecto lítico sobre la pared celular, ya que liberaría componentes proinflamatorios muy importantes como son los TAs y diversos componentes del peptidoglicano. Indirectamente, además, LytA participaría en la evasión de la inmunidad del complemento al permitir la liberación de Ply, de modo que sería la Ply liberada la responsable directa de la evasión del complemento. En el presente capítulo de la Tesis Doctoral se planteó, como principal objetivo, dilucidar si la proteína LytA, por sí misma, podría participar tanto en la evasión de los mecanismos de defensa del hospedador como participar en virulencia por un mecanismo independiente de la liberación de neumolisina.

2.1. Participación de LytA y Ply en la evasión del sistema del complemento

2.1.1. Análisis del depósito de C3b en la superficie bacteriana

Para analizar la interacción de LytA y Ply con el componente clave del sistema del complemento, se determinó el depósito de C3b en la superficie de la cepa D39 así como de sus mutantes isogénicos *lytA* (cepas P092 y P095; Tabla 2), *ply* (estirpe P097) y el mutante doble *lytA ply* (cepas P129 y P130). Las cepas deficientes en las proteínas LytA o Ply presentaron un incremento significativo en el depósito de C3b

en la superficie bacteriana en comparación con la cepa silvestre siendo aún más elevado para el mutante simple *lytA* que para el mutante *ply* ($P < 0.001$); por su parte, el doble mutante *ply lytA* mostró incluso mayores niveles de depósito de C3b que los mutantes sencillos y la cepa parental (Fig. 17). Estos resultados sugieren que la proteína LytA participa activamente en la evasión de la inmunidad del complemento mediante un mecanismo independiente de la liberación de neumolisina y que las dos proteínas participan de un modo sinérgico evitando la opsonización por el componente C3b del complemento.

Para determinar qué cascadas del complemento podrían estar afectadas por la actividad de estas proteínas se determinó el depósito de C3b utilizando sueros humanos deficientes en C1q o factor B que son, respectivamente, los primeros componentes de las vías clásica y alternativa del complemento. En ausencia de la vía clásica, cuando la activación del complemento tiene lugar mayoritariamente a través de la vía alternativa, tan sólo se produjo un incremento en el depósito de C3b en ausencia de la proteína LytA o en el doble mutante *ply lytA*, pero no en el mutante *ply*, indicando que LytA evade la activación de la vía alternativa mientras que Ply no interviene en este proceso. Sin embargo, cuando se utilizó suero deficiente en factor B, se observó un incremento en el depósito de C3b en todos los mutantes analizados, lo que demuestra que tanto Ply como LytA impiden o, al menos, dificultan la activación de la vía clásica. La ausencia, en ambos casos, de un efecto sinérgico en el depósito de C3b para el mutante doble sugiere que es necesaria la actividad de ambas vías para que se produzca la evasión sinérgica del complemento.

Para investigar qué dominio de la proteína LytA es el responsable de la evasión de C3b, la estirpe P092 (*lytA*) se opsonizó con suero humano y, a continuación, se incubó (o no) con la proteína LytA activa, su dominio de unión a colina (C-LytA) o LytA_{H133A}, un mutante de la autolisina LytA que posee una mutación en la His localizada en posición 133 que la cambia por Ala. Esta mutación da lugar a la pérdida de la actividad NAM-amidasa de LytA (resultados no publicados de los Drs. P. García y B. Blázquez que fueron quienes nos proporcionaron la proteína). También se utilizó la lisozima LytC. Los resultados mostrados en la figura 18 demostraron que sólo la adición de LytA completa y enzimáticamente activa fue capaz de reducir drásticamente los niveles de C3b en la superficie del mutante *lytA* revirtiendo a éste al fenotipo observado en la cepa silvestre. Estos datos sugirieron que LytA podría digerir el peptidoglicano de la bacteria produciendo una liberación del C3b previamente unido

pero también podrían explicarse si la NAM-amidasa actuara directamente sobre el componente C3b, hidrolizándolo siquiera en parte.

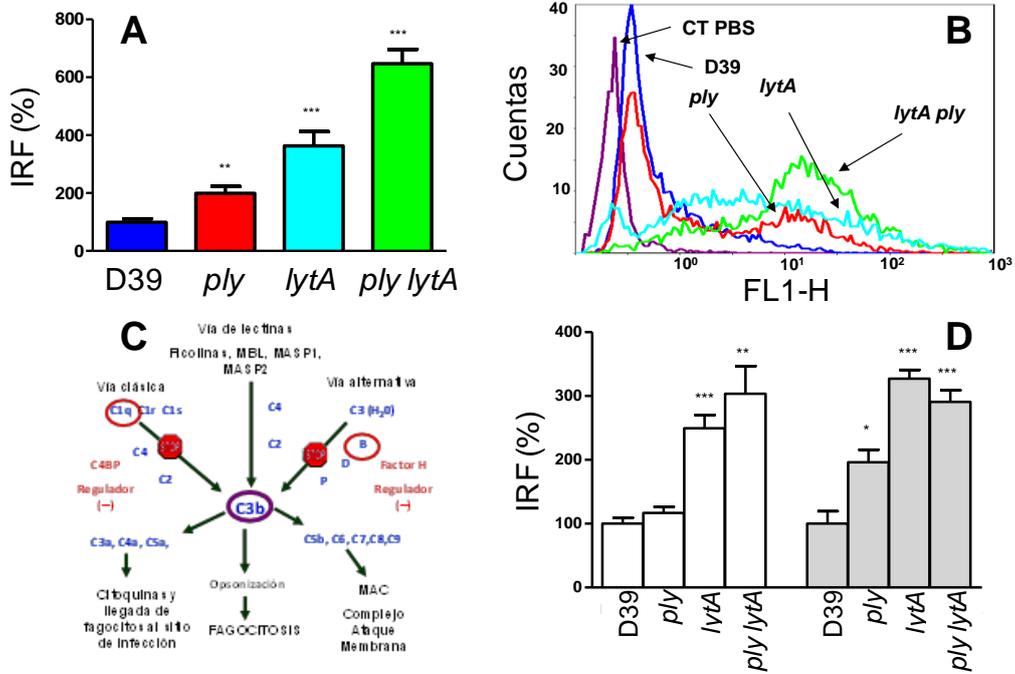


Fig. 17. Depósito de C3b sobre los mutantes *lytA*, *ply* y *lytA ply* en la cepa D39. (A) Proporción de depósito de C3b. (B) Ejemplo de histograma de citometría de flujo para el depósito de C3b. (C) Esquema de la activación del sistema del complemento. (D) Proporción de depósito de C3b en presencia de suero deficiente en C1q (barras blancas) o en presencia de suero deficiente en factor B (barras grises). Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores que son estadísticamente significativos en comparación con la cepa silvestre (Test *t* de Student de 2 colas; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Para la comparación de los mutantes con la cepa silvestre D39 se utilizó un test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnet ($P < 0.001$).

A la vista de los resultados obtenidos se planteó analizar la posible capacidad de la autolisina LytA para hidrolizar el componente C3b del complemento depositado en la superficie de neumococo. En una primera serie de experimentos, se emplearon neumococos de la cepa P031 opsonizados mediante su incubación con suero humano. Las bacterias conteniendo el C3b unido a su superficie fueron a continuación incubadas con la NAM-amidasa durante 1 h y analizadas mediante *Western blot* con un suero anti-C3b (Fig. 19A).

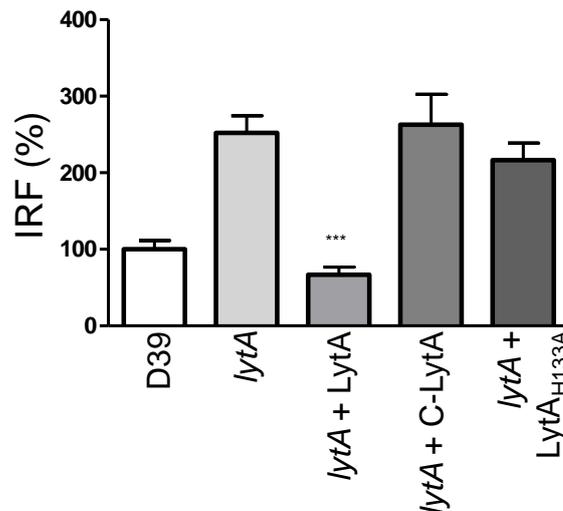


Fig. 18. Depósito de C3b sobre la cepa D39 y el mutante *lytA* en presencia de la proteína LytA, el dominio C-LytA o la proteína mutada LytA_{H133A}. Las barras de error representan la desviación estándar (DS) y los asteriscos indican los valores que son estadísticamente significativos en comparación con el mutante *lytA* (Test *t* de Student de 2 colas; ***, $P < 0.0001$).

Mientras que la adecuada estructura de C3b fue refrendada mediante su proteólisis con una mezcla de fH y fI, sólo en la muestra tratada con LytA activa se pudo observar la aparición de una proteína adicional de muy pequeño tamaño (Fig. 19A; carril 4). Para profundizar más en este hecho, se incubó C3b humano con LytA o LytA_{H133A} y se pudo confirmar la liberación de un fragmento de C3b con una masa

molecular aparente de unos 6–6.5 kDa (Fig. 19B). Desgraciadamente, aunque se llevaron a cabo repetidos esfuerzos para identificar con precisión este fragmento, ello no ha sido posible hasta el momento. Aún así podemos concluir que la proteína LytA está involucrada en la degradación de la opsonina C3b y que utiliza esta propiedad novedosa como un mecanismo de evasión del sistema de defensa del hospedador.

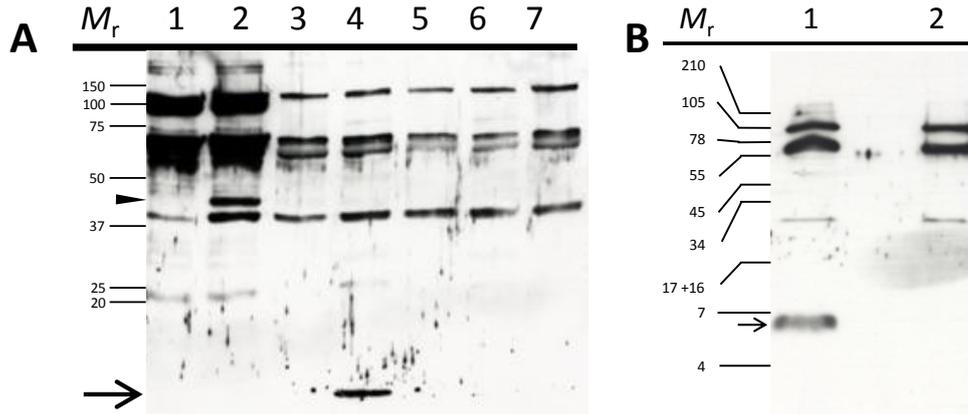


Fig. 19. Degradación de C3b por la NAM-amidasa LytA de neumococo. (A) Células de un mutante *lytA lytC* de neumococo (cepa P031) (10^6 UFC) (carriles 3–7) en PBS fueron incubadas con 10 μ l de una dilución al 50% (en PBS) de suero humano durante 30 min a 37°C. A continuación, las muestras se lavaron dos veces con PBS-Tween-20 y las células se resuspendieron en PBS. Diferentes porciones (10^6 UFC) de la muestra se incubaron con 3 ng de NAM-amidasa LytA, lisozima LytC, C-LytA, o LytA_{H133A} durante 2 h a 37°C. Se centrifugaron las muestras y una fracción de cada sobrenadante fue analizada mediante SDS-PAGE (15%), las proteínas se transfirieron a una membrana y se revelaron con suero anti-C3b. Carriles 1 a 7: C3b purificado; C3b digerido con fH y fI; sobrenadante de la cepa P031 sin posteriores adiciones; tratado con LytA; tratado con LytC; tratado con C-LytA; tratado con LytA_{H133A}. El triángulo negro marca una banda característica de la digestión de C3b con fH y fI. La flecha señala una proteína que es consecuencia de la digestión con LytA. (B) Una muestra de C3b humano (3.3 μ g cada media hora) en tampón fosfato sódico (20 mM, pH 6.9) fue tratada con LytA (carril 1) o LytA_{H133A} (carril 2). Las enzimas se añadieron cada 30 min (3 ng cada vez) y la incubación se prolongó durante 2 h a 37°C. Las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE utilizando tricina en lugar de Tris-glicina. La flecha indica la proteína extra resultante de la digestión con LytA. Se indican los M_r de los marcadores utilizados.

2.1.2. Estudio de la activación de la vía clásica del complemento

La vía clásica es la principal vía de activación del complemento frente a *S. pneumoniae* tanto en ratones como en humanos (Brown *et al.*, 2002; Yuste *et al.*, 2007). Pa-

ra estudiar la capacidad que tienen las proteínas LytA y Ply para evadir la activación de esta vía se analizó la interacción de neumococo con el primer componente C1q, así como su reconocimiento por la principal proteína de fase aguda humana, la pentraxina CRP. El mutante *ply* mostró mayores niveles de C1q (pero no de CRP) en su superficie, confirmando que Ply afecta a la activación de la vía clásica a través del componente C1q (Fig. 20). Además, la pérdida de LytA se asoció con un incremento en el reconocimiento de C1q y CRP sugiriendo que LytA evita la activación de la vía clásica del complemento reduciendo el reconocimiento de *S. pneumoniae* por C1q y CRP.

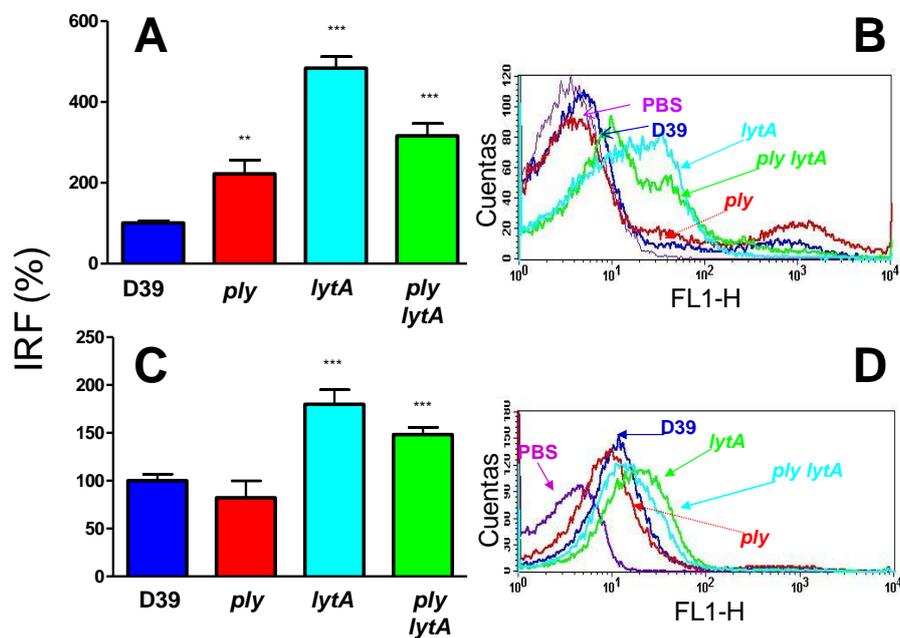


Fig. 20. Reconocimiento de la cepa D39 y los mutantes *lytA*, *ply* y *lytA ply* por parte de C1q y CRP. (A) Depósito de C1q. (B) Ejemplo de histograma de citometría de flujo para el depósito de C1q. (C) Depósito de CRP. (D) Ejemplo de histograma de citometría de flujo para el depósito de CRP. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores que son estadísticamente significativos en comparación con la cepa silvestre (Test *t* de Student de 2 colas; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). Para la comparación de todos los mutantes con la cepa silvestre se utilizó un test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnet ($P < 0.0001$).

2.1.3. Unión a reguladores negativos del complemento, C4BP y fH

Para analizar si las proteínas LytA y Ply eran capaces de reclutar reguladores negativos del sistema del complemento y así evadir la activación del mismo se determinó la unión a los componentes C4BP y fH. Dado que estudios previos de otros autores habían demostrado que la proteína PspC es capaz de unirse a ambos reguladores negativos (Dave *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2006; Hammerschmidt, *et al.*, 2007; Quin *et al.*, 2007b; Dieudonné-Vatran *et al.*, 2009; Hyams *et al.*, 2013), se incluyó un mutante isogénico *pspC* (cepa P188; Tabla 2) como control positivo y se analizó el depósito de C4BP y fH en la superficie de la cepa silvestre y de los mutantes *lytA* (cepa P092), *ply* (cepa P097) y *lytA pspC* (cepa P148). La unión de C4BP fue ligeramente menor en ausencia de Ply mientras que, de manera inesperada, la deficiencia en LytA se asoció con una marcada disminución en la unión a C4BP la cual, por otra parte, fue similar a la obtenida con el mutante *pspC* (Fig. 21). Por su parte, el doble mutante *lytA pspC* mostró niveles de C4BP aún menores que los mutantes sencillos, demostrando que las proteínas PspC y LytA participan de un modo muy eficiente en el reclutamiento de C4BP e inhiben así la activación de la vía clásica del complemento. Con el fin de confirmar la novedosa interacción de LytA con C4BP y, en la medida de lo posible, ampliar este hallazgo a otros serotipos, se evaluó la unión de C4BP utilizando la cepa S3 (Sung *et al.*, 2006; Moscoso *et al.*, 2010), el único aislado clínico de neumococo (serotipo 23F) deficiente en *lytA* descrito hasta la fecha, y un transformante *lytA*⁺, denominado S3 (*lytA*⁺), de la misma cepa. La pérdida de LytA se asoció con una marcada ausencia de unión a C4BP mientras que, la restauración de gen *lytA*, originó un incremento notable en dicha unión (Fig. 20). Estos resultados confirmaron que LytA es un ligando de *S. pneumoniae* para C4BP que no había sido descrito previamente.

El análisis de la interacción con el regulador negativo de la vía alternativa demostró que la proteína Ply no afectaba a la unión a fH mientras que el mutante en LytA presentaba niveles de fH significativamente menores en comparación con la cepa silvestre, aunque mayores a los encontrados en el mutante *pspC* (Fig. 22). Además, el transformante S3 (*lytA*⁺) de la cepa S3 mostraba un incremento significativo en la cantidad de fH depositado (Fig. 22). Además, la unión de fH al doble mutante *pspC lytA* fue significativamente menor a la encontrada en los mutantes sencillos, lo que sugería que tanto PspC como LytA participan de un modo muy eficaz en la unión a fH y, por tanto, en la evasión de la vía alternativa del complemento.

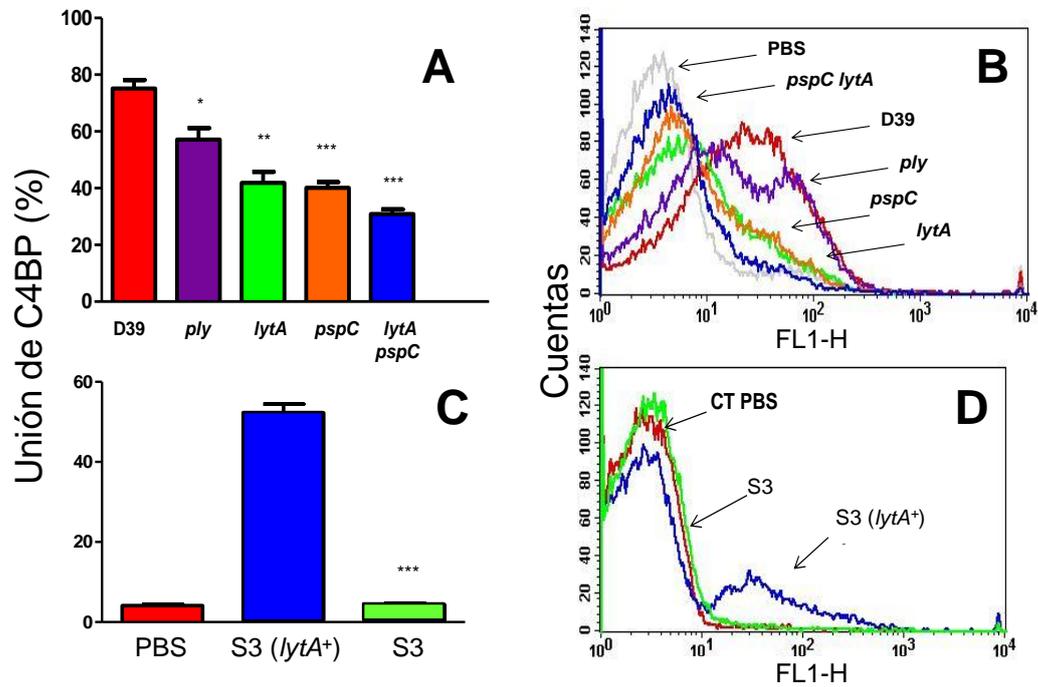


Fig. 21. Papel de LytA y Ply en la unión de C4BP. (A) Proporción de depósito de C4BP sobre los mutantes *ply*, *lytA*, *pspC* y *lytA pspC* de la cepa de neumococo D39. (B) Histograma de citometría de flujo para la unión de C4BP a la cepa D39. (C) Proporción de depósito de C4BP sobre la cepa S3, un mutante *lytA* natural de serotipo 23F, y su transformante, S3 (*lytA*⁺). (D) Histograma de citometría de flujo para la unión de C4BP a la cepa S3. Los resultados se expresan como porcentaje de unión a C4BP en relación a los resultados obtenidos con la cepa silvestre. Las barras de error representan la DS y los asteriscos marcan las diferencias estadísticamente significativas en comparación con la cepa silvestre (test *t* de Student dos colas *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$). Para la comparación de todos los mutantes con la cepa silvestre se utilizó un test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnet ($P < 0.0001$).

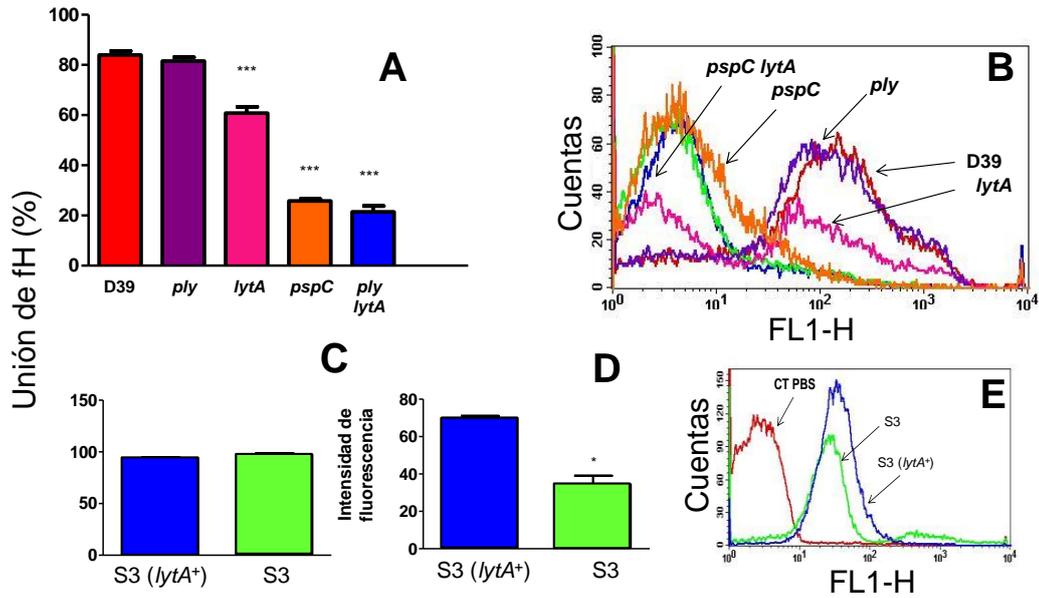


Fig. 22. Implicación de LytA y Ply en la unión de fH. (A) Depósito de fH sobre los mutantes *ply*, *lytA*, *pspC* y *lytA pspC* de la cepa D39. (B) Histograma de citometría de flujo para la unión de C4BP. (C) Proporción de depósito de fH sobre las cepas S3 y S3 (*lytA*⁺). (D) Intensidad de fluorescencia del depósito de fH en las estirpes S3 y S3 (*lytA*⁺). (E) Histograma de citometría de flujo para la unión de fH a la cepa S3 y su transformante. Las barras de error representan la DS y los asteriscos marcan las diferencias estadísticamente significativas en comparación con la cepa silvestre (test *t* de Student de dos colas *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$). Para la comparación de todos los mutantes con la cepa silvestre se utilizó un test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnet ($P < 0.0001$).

2.2. Implicación de LytA y Ply en la evasión de la fagocitosis

2.2.1. Fagocitosis mediada por macrófagos alveolares

Utilizando la línea celular MH-S (macrófagos alveolares), se observó que los mutantes sencillos *lytA* y *ply* mostraban una adhesión aumentada con respecto a la propia de la cepa silvestre (Fig. 23). La tasa de adhesión del doble mutante *lytA ply* fue incluso más elevada que las de los mutantes sencillos. Cuando se estudió el papel de ambas proteínas en la fagocitosis —analizada 1 h y 4 h después de la infección— se pudo observar que ésta era más eficiente en los mutantes sencillos que en la cepa salvaje y mayor aún en el mutante doble (D39 *lytA ply*), lo que indicaba que

tanto LytA como Ply participan en la evasión de la fagocitosis por macrófagos alveolares (Fig. 23). Además, la pérdida de ambas proteínas resultaba en una fagocitosis mucho mayor en relación a la cepa silvestre y a los mutantes sencillos, sugiriendo que la presencia de LytA y Ply, es determinante en la resistencia a la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares. Adicionalmente, los niveles de bacterias recuperados de las células se redujeron significativamente a lo largo del tiempo sugiriendo que, una vez que los macrófagos han reconocido y fagocitado a las cepas deficientes en LytA y Ply, la maquinaria del macrófago destruye a la bacteria en su interior con gran eficacia.

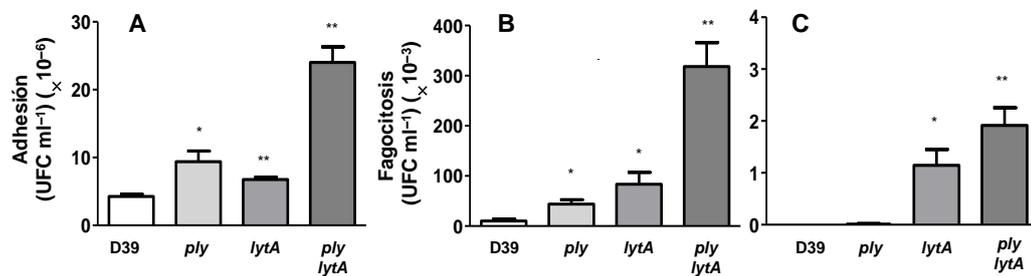


Fig. 23. Efecto de LytA y Ply en la fagocitosis mediada por macrófagos alveolares murinos. (A) Adhesión de la cepa silvestre D39 y los diferentes mutantes a los macrófagos. (B y C). Fagocitosis de la cepa silvestre D39 y los distintos mutantes 1 y 4 h después de la infección. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores que son estadísticamente significativos en relación a la cepa silvestre (test *t* de Student de 2 colas; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). $P < 0.0001$ para la comparación global de la adhesión (test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett) y $P < 0.001$ para la comparación global de la fagocitosis.

Para confirmar la hipótesis de que el macrófago destruye de un modo eficaz a los neumococos fagocitados, se utilizó el doble mutante *ply lytA* para analizar, mediante microscopía de inmunofluorescencia la localización, de la bacteria durante el transcurso de la infección utilizando distintos marcadores de la vesícula fagocítica (Fig. 24). Se observó un tránsito a través de los espacios subcelulares, inicialmente en endosomas tempranos —identificados utilizando el marcador de membrana EEA-1— y, más tarde, en endosomas tardíos que se caracterizan por poseer un pH áci-

do —mediante la tinción con los marcadores de membrana LAMP-1 y LAMP-2. Estos resultados demostraron que la pérdida de Ply y LytA incrementa la eficiencia de los macrófagos alveolares, no sólo para fagocitar, sino también para destruir *S. pneumoniae* procesando a la bacteria a través de la ruta fagolisosomal del macrófago.

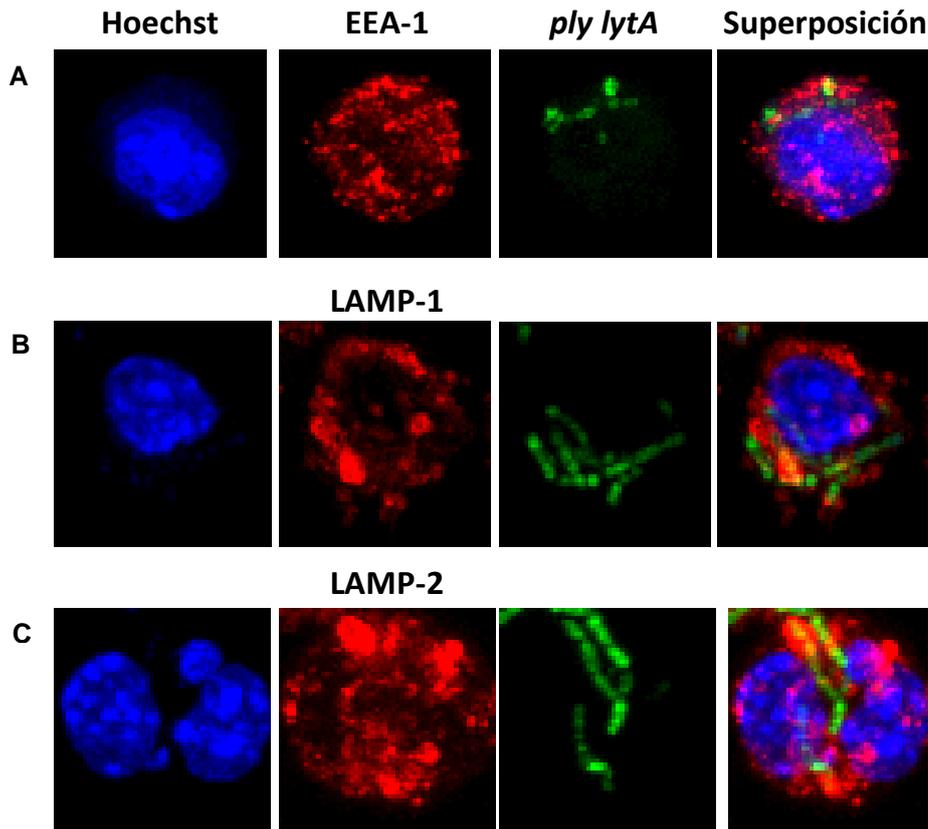


Fig. 24. Co-localización del doble mutante *lytA ply* en distintos tipos de vesículas durante el proceso de infección de macrófagos alveolares de ratón. (A) Co-localización del doble mutante *lytA ply* con el marcador de membrana EEA-1. (B) Co-localización del doble mutante *lytA ply* con el marcador de membrana LAMP-1. (C) Co-localización del doble mutante *lytA ply* con el marcador de membrana LAMP-2. El doble mutante *lytA ply* expresa la GFP (color verde) y los marcadores celulares se visualizaron con el anticuerpo correspondiente conjugado con TRITC (color rojo). Para la tinción de los núcleos celulares se utilizó Hoescht (color azul).

2.2.2. Fagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares

Para investigar la capacidad que tienen los neutrófilos de fagocitar la cepa silvestre en comparación con los mutantes deficientes en las proteínas LytA y Ply se utilizó la línea celular humana HL-60. La fagocitosis de las diferentes cepas marcadas con el fluorocromo FAM-SE se determinó mediante citometría de flujo. La fagocitosis de los mutantes sencillos *ply* y *lytA* fue significativamente mayor que la de la cepa silvestre (Fig. 25). Por otra parte, la fagocitosis del doble mutante *lytA ply* resultó ser mucho más eficiente en comparación con la cepa silvestre y los mutantes sencillos. Para corroborar la mayor susceptibilidad de estos mutantes a la fagocitosis, se utilizaron las diferentes cepas expresando la GFP y el nivel de fagocitosis se visualizó mediante microscopía confocal (Fig. 26). Las imágenes obtenidas confirmaron una mayor fagocitosis de los mutantes sencillos así como un incremento muy marcado en la fagocitosis del doble mutante.

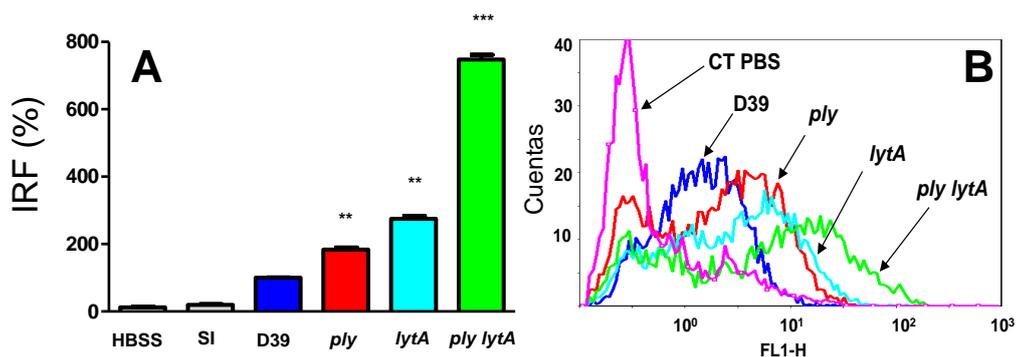


Fig. 25. Implicación de la autolisina LytA y la neumolisina en la opsonofagocitosis mediada por neutrófilos humanos. (A) Fagocitosis de la cepa D39 y de los diferentes mutantes incubados en HBSS, suero inactivado por calor (SI) y 20% de suero humano. Los resultados están expresados como porcentajes del índice de fluorescencia (IRF) con respecto a la cepa silvestre. (B) Histograma de citometría de flujo. Las barras de error representan la DS y los asteriscos representan los valores que son estadísticamente significativos en comparación con la cepa silvestre (Test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). $P < 0.0001$ para la comparación global de la fagocitosis (test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett).

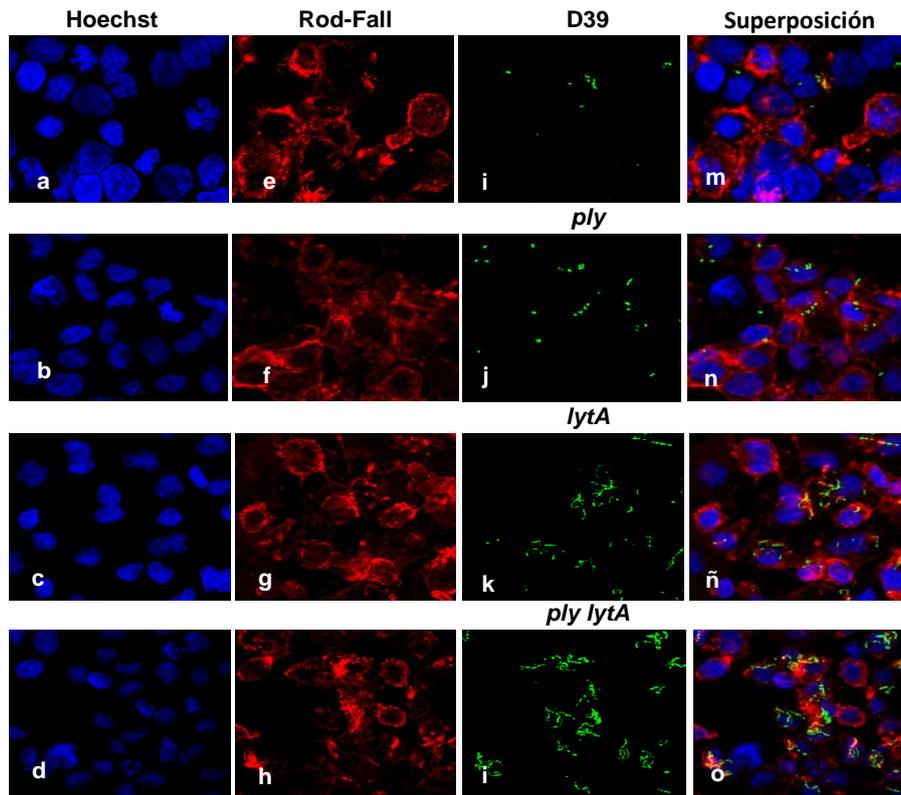


Fig. 26. Fagocitosis de *S. pneumoniae* mediada por PMNs. (a–d) Marcaje de los núcleos de los PMNs mediante Hoechst (color azul). (e–h) Marcaje del citoesqueleto de actina de los PMNs con rodamina-faloidina (Rod-Fall) (color rojo). (i–l) Las células de *S. pneumoniae* D39 y los mutantes *ply*, *lytA* y *lytA ply* expresando GFP (color verde). (m–o) Superposición de los tres canales.

2.3. Contribución de *LytA* y *Ply* a la patogénesis de la enfermedad neumocócica

2.3.1. Modelo de sepsis

Se analizó el papel de *LytA* y *Ply* en un modelo murino de sepsis. Para ello se inocularon los diferentes mutantes, P095 (*lytA*), P097 (*ply*) o P130 (*lytA ply*) y la correspondiente cepa parental (D39) por vía ip y se estudió el papel que desempeñan

estas proteínas en la infección sistémica. Los mutantes *lytA* y *ply* mostraron una clara atenuación en virulencia ya que fueron recuperados en niveles más bajos que la cepa D39. En relación al doble mutante se observó que tenía una capacidad para multiplicarse en sangre muy reducida en comparación con la cepa silvestre y los mutantes sencillos (Fig. 27).

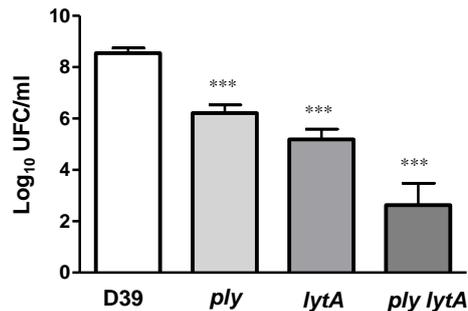


Fig. 27. Bacteriemia en ratones C57BL/6 infectados con la cepa D39 y los mutantes indicados. Las barras de error representan las DS y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos (test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). $P < 0.0001$ para la comparación global de la fagocitosis (test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett).

2.3.2. Modelo de neumonía

Para profundizar en el estudio de la atenuación en virulencia de las mutaciones en *LytA* y *Ply*, se inocularon la cepa D39 y sus correspondientes mutantes en un modelo experimental de neumonía. Los mutantes *lytA* y *ply* se recuperaron en menores niveles que la cepa silvestre en cada una de las tres localizaciones estudiadas, esto es, BALF, pulmón y sangre, lo que indica que los mutantes en *LytA* y *Ply* poseen una capacidad limitada para multiplicarse en el tracto respiratorio inferior así como para diseminarse desde el pulmón a la sangre (Fig. 28). La infección con el mutante doble permitió observar una drástica atenuación en virulencia en comparación con

RESULTADOS

la cepa silvestre y los mutantes sencillos demostrando que la pérdida de ambas proteínas confiere a la bacteria una capacidad muy reducida para producir infección pulmonar y diseminación sistémica desde el pulmón.

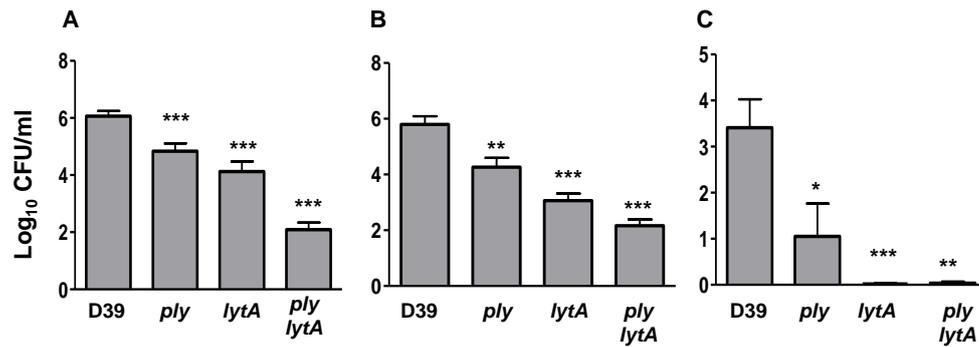


Fig. 28. Niveles bacterianos en ratones C57BL/6 infectados con la cepa D39 y los mutantes indicados en un modelo de neumonía. (A) BALF. (B) Pulmón. (C) Sangre. Las barras de error representan las DS y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos (test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; *, $P < 0.001$).**

3. IMPLICACIÓN DEL RECEPTOR PSGL-1 EN LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

3.1. *Papel del receptor PSGL-1 en la fagocitosis mediada por PMNs*

El ligando de la glicoproteína P-selectina 1 (PSGL-1) está presente en neutrófilos e interacciona con las selectinas E y P de células endoteliales y epiteliales para que éstas puedan extravasarse y migrar al sitio de infección o de daño tisular. Este receptor, que ha sido identificado como receptor funcional de entrada en neutrófilos para distintos patógenos intracelulares, ha sido objeto de estudio en esta Tesis para dilucidar si la fagocitosis de *S. pneumoniae* podría también estar mediada por este receptor. Inicialmente, se determinó el nivel de expresión de dicho receptor en la línea celular HL-60 ya que se ha visto que esta línea celular expresa niveles de PSGL-1 similares a los de neutrófilos de sangre periférica (Park *et al.*, 2003; Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004). Estos niveles se mantenían en torno al 90–95% entre los días 4 y 5 tras la diferenciación de la línea celular, que es cuando las células expresan la mayor proporción de receptores fagocíticos de neutrófilos (Fleck *et al.*, 2005) (datos no mostrados).

Con el fin de determinar si PSGL-1 es un receptor que participa en la fagocitosis de neumococo, se infectaron las células HL-60 bloqueando el receptor con el anticuerpo KPL-1 o, como control de isotipo, una inmunoglobulina que no le afectara. Cuando se bloqueó el receptor (Fig. 29), la fagocitosis de la cepa silvestre y, en mayor medida, la de los diferentes mutantes, fue menor que cuando el receptor estaba activo, lo que sugiere que la fagocitosis de estas cepas podría estar mediada, al menos en parte, por el receptor PSGL-1.

Estos estudios se complementaron con ensayos de microscopía confocal en los que se detectó el receptor PSGL-1 y su co-localización con la bacteria. Las imágenes obtenidas (Fig. 30) corroboraron que la bacteria interacciona con el receptor PSGL-1. El conjunto de estos estudios permiten concluir que el receptor PSGL-1 presente en neutrófilos es parcialmente responsable del reconocimiento de neumococo y que las proteínas Ply y LytA participan reduciendo la fagocitosis mediada por este receptor.

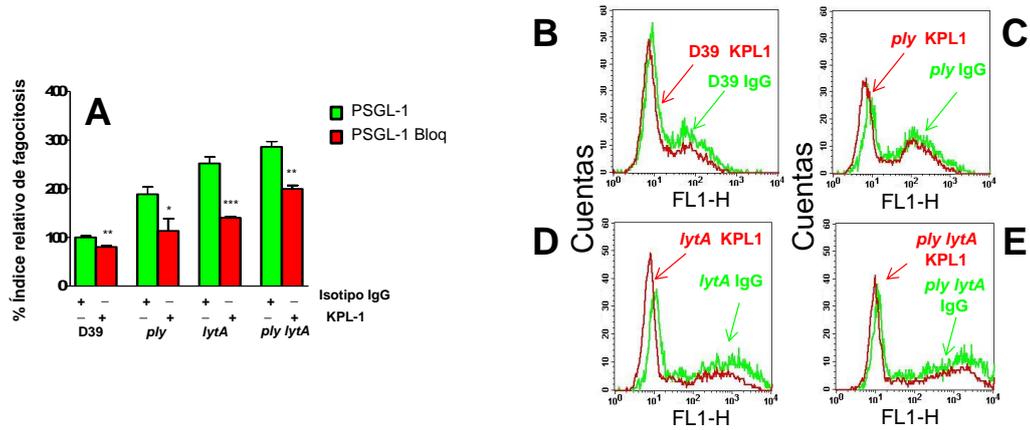


Fig. 29. Opsonofagocitosis mediada por PMNs. Las barras verdes representan la fagocitosis mediada por las células HL-60 con el receptor PSGL-1 activo utilizando un anticuerpo de ratón anti-IgG humana, como control de isotipo. Las barras rojas (PSGL-1 Bloq) muestran la fagocitosis mediada por las células HL-60 tratadas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-PSGL-1 humano (KPL-1). Las barras de error representan la DS y los asteriscos representan los valores que son estadísticamente significativos en comparación con las células con el receptor no bloqueado (Test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Para ilustrar aún mejor esta conclusión, la infección con el doble mutante fue estudiada microscópicamente. Cuando el receptor PSGL-1 estaba activo, se observó una activa fagocitosis y la mayoría de las células presentaban, al final del proceso, neumococos asociados (Vídeo 1A). Sin embargo, cuando se bloqueó con el anticuerpo anti-PSGL-1 humano, el reconocimiento y fagocitosis de *S. pneumoniae* se vieron reducidos (Vídeo 1B).

3.1.1. La fagocitosis de neumococo a través del receptor PSGL-1 requiere la fosforilación de la tirosina quinasa SYK

La expresión de PSGL-1 en la superficie del neutrófilo está mediada por la tirosina quinasa SYK, que necesita fosforilarse para alcanzar su estado conformacional activo, de modo que, tras la activación de PSGL-1, se produce la fosforilación de SYK y la activación transcripcional (Fig. 31).

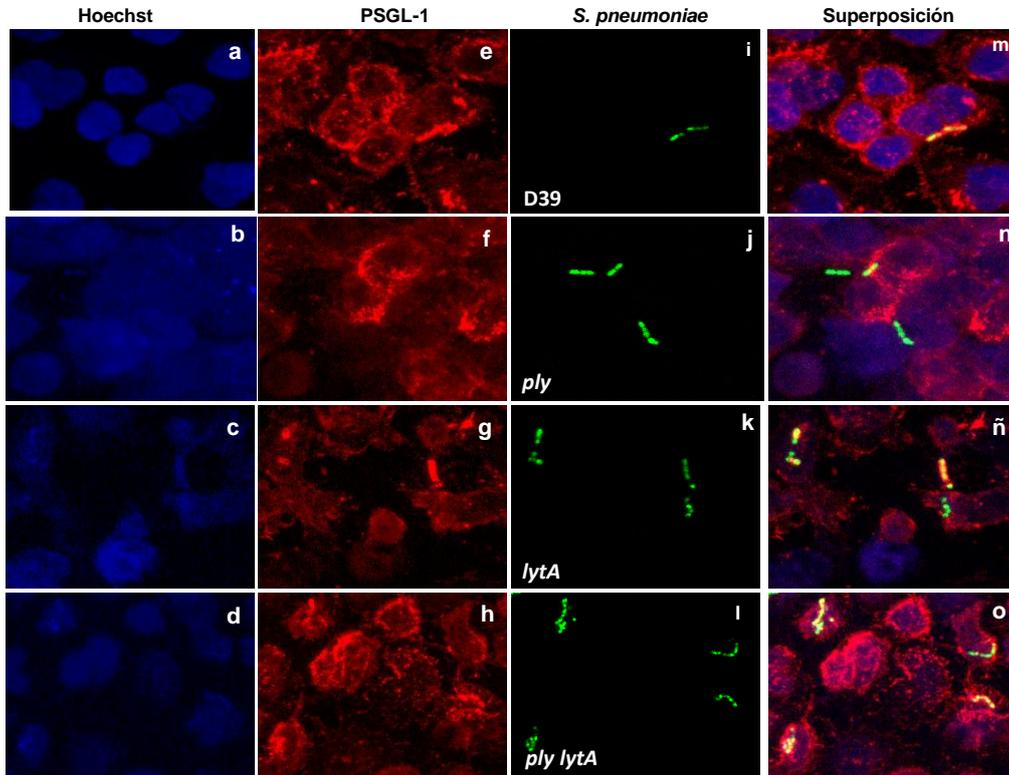


Fig. 30. Fagocitosis de *S. pneumoniae* y los correspondientes mutantes por células HL-60 diferenciadas a neutrófilos expresando el receptor PSGL-1. (a–d) Marcaje de los núcleos de los PMNs mediante Hoechst (color azul). (e–h) Visualización de PSGL-1 (color rojo). (i–l) *S. pneumoniae* D39 y mutantes *ply*, *lytA*, y *lytA ply* (color verde). (m–o) Superposición de los tres canales.

Las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos se trataron con piceatannol (3, 3', 4, 5'-*trans*-trihidroxiestilbeno), un inhibidor farmacológico específico de SYK (Piotrowska *et al.*, 2012), con el fin de determinar la contribución de esta tirosina quinasa a la fagocitosis de neumococo mediada por PSGL-1 (Oliver *et al.*, 1994). Se observó una disminución significativa en la fagocitosis de las diferentes cepas, siendo este efecto más notable para los diferentes mutantes (Fig. 32), lo que sugiere que la fa-

gocitosis de *S. pneumoniae* está mediada por el receptor PSGL-1 a través de un mecanismo dependiente de la tirosina quinasa SYK.



Vídeo 1. Fagocitosis del mutante *lytA ply* de neumococo (cepa P168) mediada por PMNs. (A) Control no tratado (<https://vimeo.com/63228836>). (B) Los PMNs fueron tratados con KPL1, un anticuerpo monoclonal frente a PSGL-1, antes de la adición de las bacterias (<https://vimeo.com/63228838>). Para la realización del vídeo, se tomaron imágenes, a intervalos de 20–30 segundos, desde el momento en el que se infectaron las células y durante 45 minutos. Para visualizar los vídeos es necesario un lector de códigos QR disponible, de forma gratuita, desde cualquier teléfono inteligente.

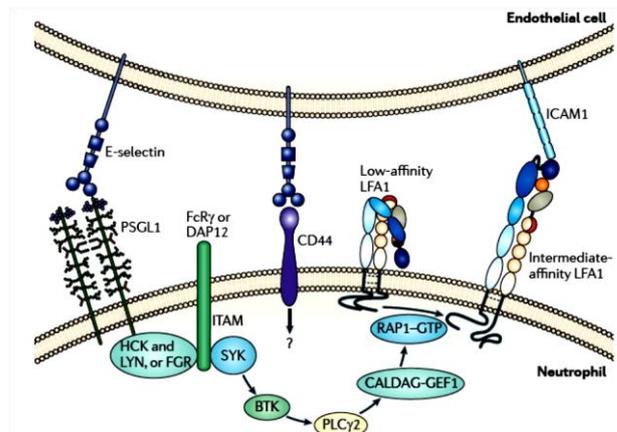


Fig. 31. Ruta de señalización de la activación de PSGL-1. La señalización desde E-selectina a sus ligandos PSGL-1 y CD44 sobre neutrófilos da lugar a una vía definida consistente de una tirosina quinasa de la familia SRC (FGR, HCK y LYN), una proteína conteniendo (ITAM) el motivo de activación basado en un inmunorreceptor de tirosina (receptor FcR γ o DAP12), y una tirosina quinasa del bazo (SYK). Modificado de Hogg *et al.* (2011).

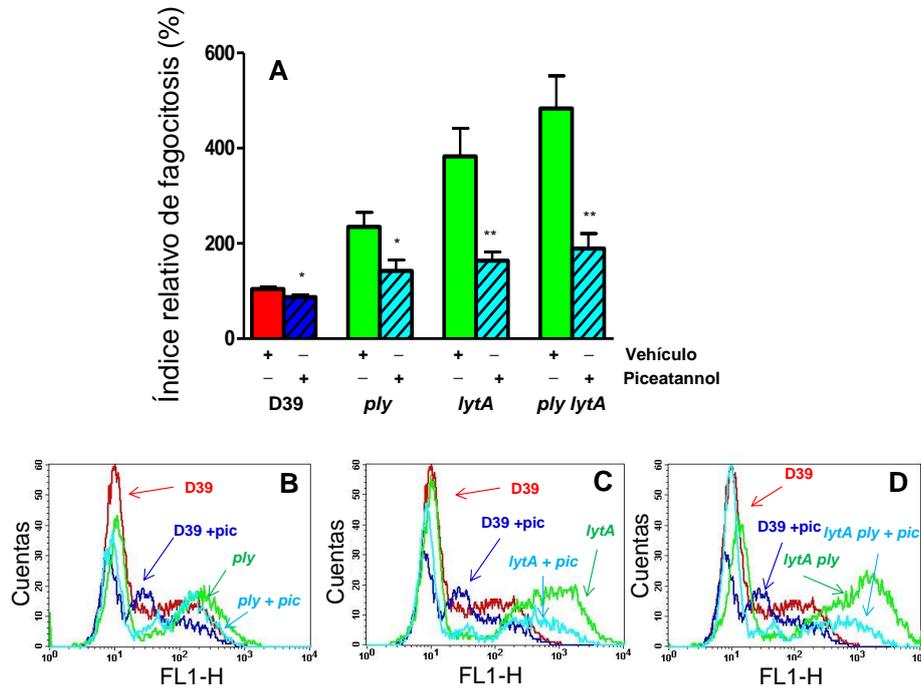


Fig. 32. Opsonofagocitosis mediada por las células HL-60 diferenciada a neutrófilos en presencia de piceatannol. (A) Fagocitosis de la cepa D39 y de los diferentes mutantes incubados en presencia (o ausencia; barras rayadas) de piceatannol en relación con los valores obtenidos con la cepa silvestre. (B–D) Ejemplos de histogramas de citometría de flujo. Las barras de error representan la DS y, los asteriscos, los valores estadísticamente significativos en comparación con las células no tratadas con el inhibidor (pic, piceatannol) (Test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

3.2. Importancia de PSGL-1 en la neumonía y sepsis neumocócicas

Para determinar la relevancia fisiológica del receptor PSGL-1 en la fagocitosis y eliminación de neumococo, se estableció un modelo murino de neumonía y sepsis neumocócica utilizando ratones silvestres y ratones deficientes en dicho receptor.

3.2.1. Modelo de neumonía

Se infectaron grupos de animales por vía in con la cepa virulenta D39 y los niveles de bacteria se determinaron a las 24 h a partir de muestras de BALF, pulmón y sangre. La bacteria recuperada de los pulmones en ratones silvestres no mostró diferencias significativas en comparación con la bacteria recuperada de los ratones PSGL-1^{-/-}. Por el contrario, en el BALF de los ratones silvestres se observó un ligero descenso en los niveles bacterianos (Fig. 33). Sin embargo, el efecto más notable se observó cuando se analizó la bacteriemia, con diferencias de más de 100 veces en los recuentos entre los animales silvestres y los ratones PSGL-1^{-/-}. Este estudio confirma que el receptor PSGL-1 juega un importante papel evitando o, al menos, reduciendo la severidad del proceso invasivo.

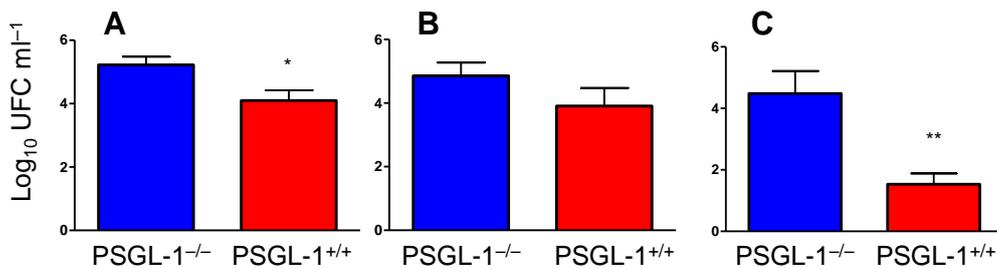


Fig. 33. Infección neumocócica de ratones silvestres y ratones deficientes en PSGL-1 en un modelo de neumonía. Las barras azules representan las bacterias recuperadas de ratones deficientes en PSGL-1 y las rojas corresponden a las recuperadas de ratones silvestres en diferentes localizaciones (A) BALF, (B) pulmón, y (C) sangre a las 24 h post-infección. Las barras de error representan las DS y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos (test *t* de Student de dos colas; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

3.2.2. Modelo de sepsis

La implicación del receptor PSGL-1 como mecanismo de defensa inmune del hospedador frente a la sepsis neumocócica se analizó tras la inoculación de ratones silvestres o deficientes en PSGL-1 con una dosis letal de la cepa D39 por vía ip. La bacteriemia se cuantificó a partir de muestras obtenidas de la vena de la cola a las 6 y a las 24 h post-infección, cuando todos los animales estaban aún vivos. Los niveles bacterianos en la sangre de ratones PSGL-1^{-/-} fueron muy superiores (≥ 100 veces) a los encontrados en los ratones silvestres a los dos tiempos ensayados (Fig. 34).

Además, se investigó el papel del receptor PSGL-1 en la supervivencia a los siete días utilizando un modelo de sepsis. Los animales deficientes en PSGL-1 desarrollaron una infección mucho más agresiva y fulminante, con un 100% de mortalidad a las 56 h post-infección frente a, tan sólo, un 20% de mortalidad en el grupo de los ratones silvestres a ese tiempo, y a los 7 días (Fig. 35). Los resultados de este estudio confirmaron que PSGL-1 contribuye de modo muy significativo a la protección frente a neumococo favoreciendo la eliminación de la bacteria de la circulación sanguínea y, así, disminuyendo la severidad de la sepsis neumocócica.

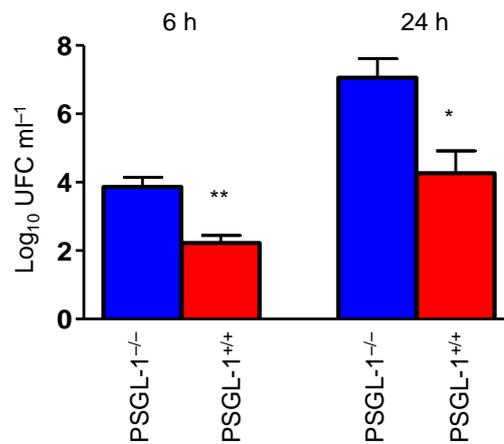


Fig. 34. Infección neumocócica de ratones silvestres y ratones deficientes en PSGL-1 en un modelo de sepsis. Las barras azules y rojas corresponden, respectivamente, a la bacteriemia en ratones deficientes en PSGL-1 y en ratones silvestres. Las barras de error representan las DS y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos (test *t* de Student de dos colas; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

3.2.3. Respuesta inflamatoria en ratones silvestres y mutantes PSGL-1^{-/-}

Se determinaron los niveles de citoquinas pro-inflamatorias procedentes de muestras de suero y BALF de ratones silvestres y PSGL-1^{-/-} infectados por vía in con la cepa D39 de neumococo. En BALF, los niveles de citoquinas en los ratones PSGL-1^{-/-} fueron similares (o, a veces, ligeramente menores) a los obtenidos en los ratones silvestres (Tabla 6). Sin embargo, los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias fueron mayores en los ratones mutantes con valores significativamente más elevados de IL-5, IL-6 e IFN- γ ($P < 0.05$), lo cual es compatible con la bacteriemia más elevada encontrada en los animales PSGL-1^{-/-}.

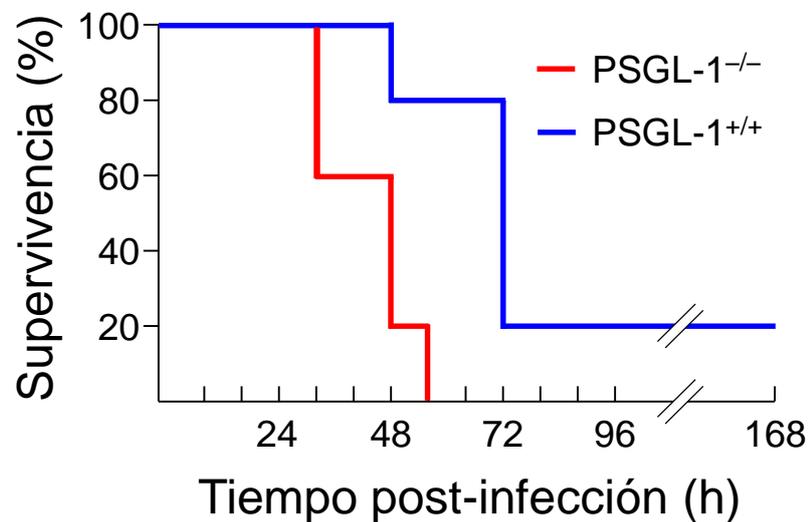


Fig. 35. Curvas de supervivencia. La línea roja representa la supervivencia de los ratones deficientes en PSGL-1 y la azul, la de los ratones silvestres. Los ratones se infectaron con *S. pneumoniae* D39. ** $P < 0.01$ (test de Mantel Cox)

Tabla 6. Niveles de citoquinas pro-inflamatorias procedentes de muestras de suero y BALF de ratones infectados con neumococo.

Citoquina	Estirpe de ratón			
	<i>PSGL-1^{-/-}</i>		<i>PSGL-1^{+/+}</i>	
	BALF	Suero	BALF	Suero
IL-2	2.34 ± 0.69	14.41 ± 11.20	4.33 ± 2.25	12.23 ± 6.40
IL-4	2.53 ± 0.19	6.81 ± 0.60	3.47 ± 0.86	5.58 ± 1.32
IL-5	5.27 ± 6.40	115 ± 76 ^a	1.13 ± 0.50	11 ± 7 ^a
IL-6	520 ± 398	27.54 ± 6.50 ^b	504 ± 367	11.66 ± 6.80 ^b
IL-10	17.52 ± 12.50	276 ± 49	7.65 ± 1.52	258 ± 149
IL-12p70	40.50 ± 12.50	16.55 ± 4	31.8 ± 11	47.66 ± 14.6
GM-CSF	44.50 ± 8.30	146 ± 89	74 ± 35	150 ± 91
TNF- α	399 ± 307	706 ± 618	476 ± 273	445 ± 264
IFN- γ	7.03 ± 4.40	37.63 ± 3.74 ^c	26.89 ± 7.52	20.48 ± 10.27 ^c

^{a, b, c} Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

4. RESPUESTA DEL HOSPEDADOR FRENTE A LA INFECCIÓN POR *S. PNEUMONIAE* EN PRESENCIA DE ANTIBIÓTICOS

Existen evidencias previas que demuestran que el éxito en la eliminación de las infecciones provocadas por *S. pneumoniae* depende de un correcto funcionamiento del sistema inmune del hospedador y que dicho éxito se ve favorecido por la implantación de un tratamiento antibiótico adecuado (Martín *et al.*, 1997; Severin *et al.*, 1997; Gómez-Lus *et al.*, 1997, 1998). Una amenaza muy real en la lucha frente a la ENI es la aparición de cepas con altos niveles de resistencia antibiótica que podrían poner en peligro el éxito del tratamiento antibiótico empleado. En el caso de cepas que presentan niveles muy elevados de resistencia, las concentraciones de antimicrobianos alcanzadas en suero podrían ser insuficientes y, en este caso, el desenlace de la infección dependerá de la interacción entre los factores de virulencia de la bacteria y los mecanismos inmunes del huésped. Por ello, se planteó analizar si la presencia de determinados antibióticos en concentraciones por debajo de la CMI, podría mejorar el reconocimiento y eventual eliminación de neumococo por los mecanismos de defensa del huésped.

4.1. Papel de los antibióticos β -lactámicos CDN y CRO en la inmunidad mediada por el sistema de complemento

En primer lugar, se investigó si la inmunidad mediada por el sistema del complemento mejora en presencia de concentraciones subinhibitorias de los antibióticos β -lactámicos CDN y CRO. Para ello, se utilizaron tres aislados clínicos de *S. pneumoniae* con diferentes niveles de resistencia, concretamente, las cepas 48, 69 y 1515/97 (Tabla 2). Se analizó el reconocimiento de neumococo por las proteínas de fase aguda CRP y SAP al igual que por los componentes del complemento C1q y C3b. También se investigó el efecto en fagocitosis que tenía la incubación de los diferentes aislados resistentes de neumococo con sueros y, ello, tanto en presencia como en ausencia de concentraciones subinhibitorias de CDN y CRO. Para estos experimentos se utilizó la línea celular humana HL-60 previamente diferenciada a neutrófilos así como neutrófilos murinos obtenidos directamente de sangre periférica.

4.1.1. Reconocimiento de cepas resistentes de neumococo por proteínas de fase aguda

Los estudios de susceptibilidad antimicrobiana mostraron que los tres aislados clínicos eran resistentes a los antibióticos β -lactámicos utilizados, mostrando la cepa 48 los niveles más altos (Tabla 7). Todas las cepas fueron susceptibles a LVX —como miembro representativo del grupo de las fluoroquinolonas—, resistentes a todos los macrólidos evaluados y a TET mientras que, únicamente la cepa 1515/97 fue resistente a CHL.

Tabla 7. Perfiles de susceptibilidad antimicrobiana de los diferentes aislados clínicos

Antibiótico	CMI (mg l^{-1}) ^a		
	48 (23F)	69 (19F)	1515 (6B)
AMX	16	2	2
AZM	1024	8	1024
CDN	4	2	1
CHL	4	4	32
CRO	8	4	2
CTX ^b	8	4	2
ERY	1024	16	1024
LVX	1	1	1
MDM	128	2	128
TET	128	64	8

^a Se indican los nombres de las cepas y, entre paréntesis, su serotipo.

^b CTX, cefotaxima.

La interacción con proteínas de fase aguda se determinó mediante un ensayo de citometría de flujo analizando el reconocimiento de las tres cepas de *S. pneumoniae* por CRP humana y SAP de origen murino, en presencia o ausencia de concentraciones subinhibitorias de CDN y CRO. Como se muestra en la figura 35, la unión de CRP y SAP a cada una de las cepas se incrementó significativamente en presencia de concentraciones subinhibitorias de ambos antibióticos para las tres cepas de estudio. Estos resultados sugieren que el reconocimiento de cepas resistentes de *S.*

pneumoniae por parte de proteínas de fase aguda mejora cuando las bacterias han sido expuestas a antibióticos β -lactámicos.

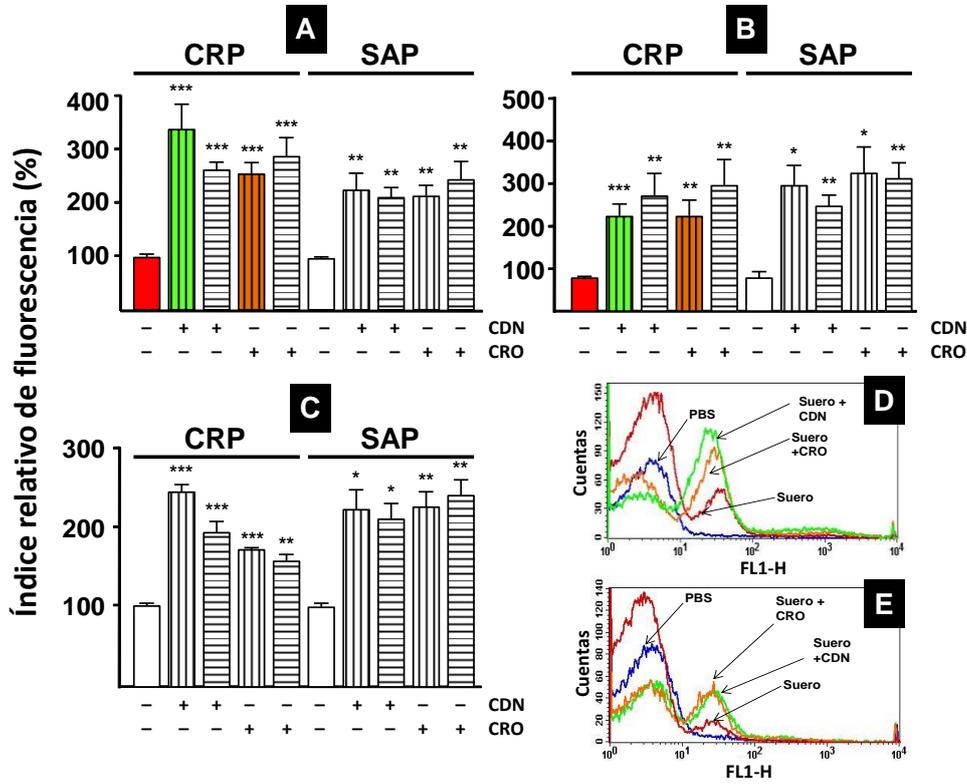


Fig. 35. Unión de proteínas de fase aguda a neumococo en presencia o ausencia de CDN o CRO. Todas las muestras fueron incubadas en presencia del correspondiente suero (humano para CRP y murino para SAP) suplementado o no con el antibiótico indicado en cada caso. La concentración de antibiótico utilizada fue $0.5 \times$ CMI (barras rayadas verticalmente) o $0.25 \times$ CMI (barras rayadas horizontalmente). Los paneles A, B y C corresponden, respectivamente, a las cepas 48 (23F), 69 (19F) y 1515/97 (6B). Los paneles D y E muestran sendos ejemplos de histogramas de citometría de flujo para la unión de CRP a las cepas 48 y 69. Los colores de las diversas curvas se corresponden con las barras del mismo color de los paneles A y B. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$. $P < 0.001$ para los serotipos 23F y 6B; $P < 0.05$ para el serotipo 19F en la comparación múltiple de la unión de CRP. $P < 0.05$ para los serotipos 23F y 19F; $P < 0.01$ para el serotipo 6B en la comparación múltiple de la unión de SAP.

4.1.2. Activación de la vía clásica del complemento

Para investigar el posible papel que desempeñan los antibióticos β -lactámicos en la activación de la vía clásica del complemento frente a neumococo, se cuantificó el depósito del componente C1q humano y murino en la superficie bacteriana, en presencia o ausencia de concentraciones subinhibitorias de CDN o CRO. Las bacterias incubadas en suero humano o de ratón que contenían 0.5 o 0.25 veces la CMI de CDN o CRO, mostraron niveles de C1q unido en la superficie bacteriana mayores que aquellas incubadas únicamente en suero sin antibióticos (Fig. 36).

4.1.3. Depósito de C3b mediada por anticuerpos específicos en presencia de concentraciones subinhibitorias de CDN o CRO

Con el fin de determinar si la presencia de CDN o CRO confiere un mayor reconocimiento de neumococo por el componente clave C3b, se analizó el depósito de esta proteína en la superficie de los tres aislados de neumococo en presencia o ausencia de concentraciones subinhibitorias de ambos antibióticos. Los neumococos se incubaron en PBS y suero inactivado por calor, como controles negativos, y en suero de ratones previamente inmunizados frente a neumococo. El suero inactivado por calor carece de la actividad del complemento pero, al conservar la función de los anticuerpos, facilita la especificidad del ensayo para detectar C3b funcional. Los niveles de IgG más bajos fueron los del grupo control (59 mg ml^{-1}), mientras que los de los grupos que habían sido inmunizados con el serotipo 6B presentaba los mayores niveles de anticuerpos específicos. Los niveles totales de IgG determinados en suero hiperinmune fueron 1056 mg ml^{-1} , en los ratones inmunizados con la cepa de serotipo 6B, 371 mg ml^{-1} , en los inmunizados con la cepa de serotipo 19F, y 251 mg ml^{-1} en aquellos inmunizados con la cepa de serotipo 23F. Estos resultados confirmaron que los ratones inmunizados generan anticuerpos específicos en respuesta a la inmunización por vía ip.

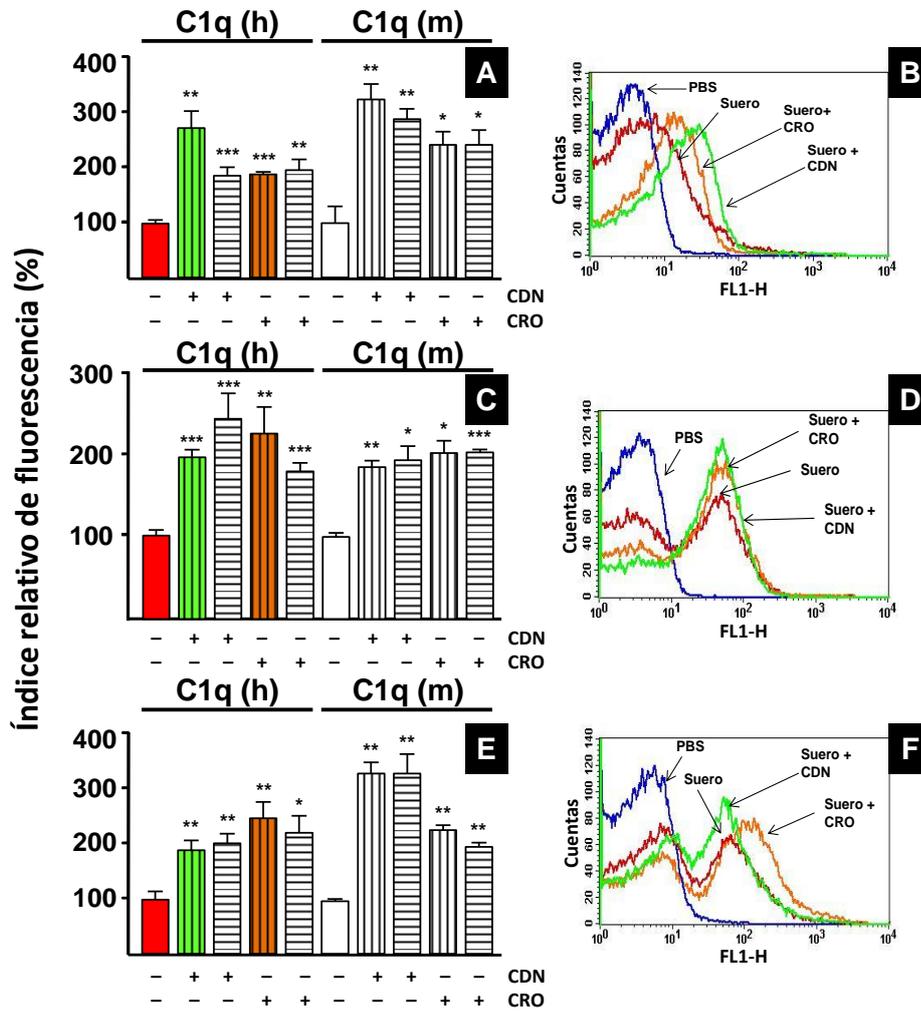


Fig. 36. Depósito de C1q humano (h) o murino (m) en presencia o ausencia de CDN y CRO. Todas las muestras fueron incubadas en presencia del correspondiente suero suplementado o no con el antibiótico indicado. La concentración de antibiótico utilizada fue $0.5 \times \text{CMI}$ (barras rayadas verticalmente) o $0.25 \times \text{CMI}$ (barras rayadas horizontalmente). Los paneles A, C y E corresponden, respectivamente, a las cepas 48 (23F), 69 (19F) y 1515/97 (6B), mientras que B, D y F muestran los correspondientes ejemplos de histogramas de citometría de flujo. Los colores de las diversas curvas se corresponden con las barras del mismo color de los paneles A, C y E. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$. $P < 0.001$ para los serotipos 23F y 19F; $P < 0.05$ para el serotipo 6B en la comparación múltiple de la unión de C1q humano. $P < 0.001$ para los serotipos 23F y 6B y $P < 0.05$ para el serotipo 19F en la comparación múltiple de la unión de C1q de ratón.

Las bacterias fueron opsonizadas con su correspondiente suero en presencia o no de CDN o CRO y se determinó el depósito de C3b. No se detectó C3b en la superficie de las bacterias incubadas con PBS o suero inactivado, confirmando la especificidad del ensayo. La opsonización con el correspondiente suero en presencia de antibióticos incrementó de forma significativa los niveles de C3b en la superficie bacteriana en comparación a la opsonización en ausencia de antibióticos (Fig. 37). La cepa de serotipo 6B mostró los mayores niveles de esta proteína en presencia de concentraciones subinhibitorias de CDN o CRO lo que podría estar relacionado con los mayores niveles de IgG del correspondiente suero. En general, el depósito de C3b fue ligeramente más elevado cuando la bacteria se opsonizó con suero conteniendo anticuerpos específicos y concentraciones subinhibitorias de CDN en comparación con CRO, aunque esto sólo fue significativo para la cepa 6B ($P < 0.05$) (Fig. 37).

Para demostrar la importancia de los anticuerpos específicos en el incremento de C3b mediado por CDN y CRO, la bacteria se incubó con suero no inmune y los resultados fueron comparados con los obtenidos con suero inmune. Los resultados obtenidos demostraron que la presencia de anticuerpos específicos es necesaria para que se produzca un incremento en el depósito de C3b inducida por concentraciones subinhibitorias de los antibióticos β -lactámicos (Fig. 38). Por último, se investigó si este mayor incremento de C3b mediado por los antibióticos CDN y CRO era debido a la activación de la vía clásica del complemento o de la vía alternativa. Para ello, el suero inmune fue tratado con EGTA para bloquear los iones Ca^{2+} necesarios para la activación de la vía clásica y la de las lectinas, de modo que la única cascada funcional fuera la vía alternativa. Los resultados mostraron que, cuando la vía clásica no era funcional, no se producía incremento alguno en el depósito de C3b (Fig. 38).

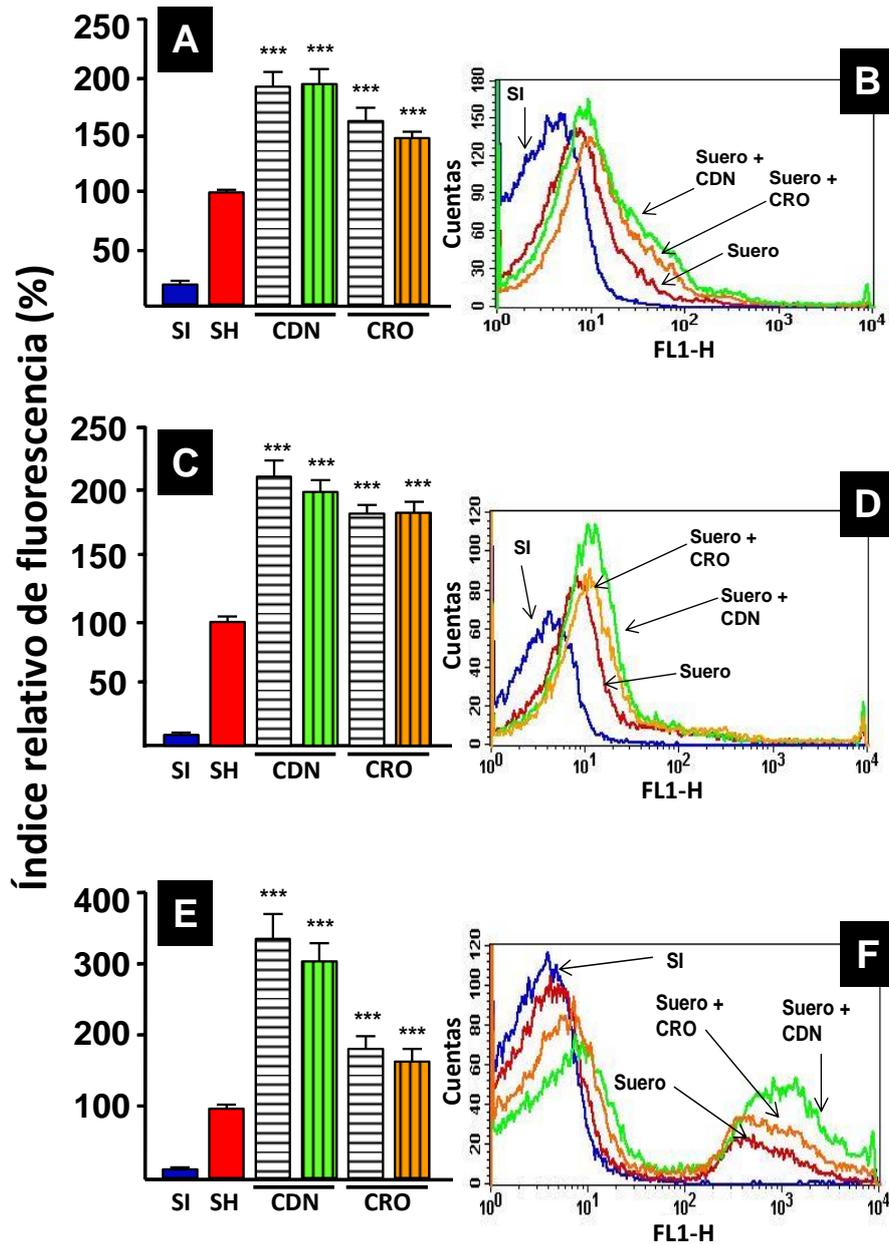


Fig. 37. Depósito de C3b murino sobre la superficie de las diferentes cepas usando suero hiperinmune con anticuerpos específicos en presencia o ausencia de CDN o CRO. La concentración de antibiótico utilizada fue $0.5 \times$ CMI (barras rayadas horizontalmente) o $0.25 \times$ CMI (barras rayadas verticalmente). Los paneles A, C y E corresponden, respectivamente, a las cepas 48 (23F), 69 (19F) y 1515/97 (6B) mientras que B, D y F muestran los correspondientes ejemplos de histogramas de citometría de flujo. Los colores de las diversas curvas se corresponden con las barras del mismo color de los paneles A, C y E. SI, suero inactivado por calor; SH, suero hiperinmune; ***, $P < 0.001$. $P < 0.001$ para todas las cepas en la comparación múltiple.

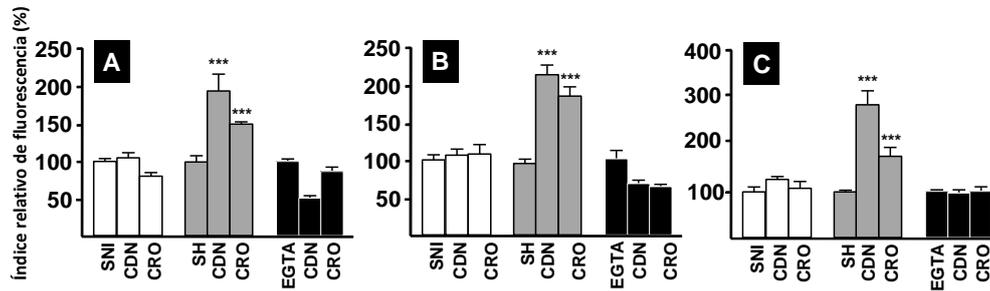


Fig. 38. Depósito de C3b sobre diferentes cepas de *S. pneumoniae*. Se utilizó suero de ratón no inmune (SNI) (barras blancas), hiperinmune (SH) (barras grises), o SH tratado con 2 mM EGTA (barras negras) en ausencia o presencia de 0.5 × CMI de CDN o CRO. Los paneles A, B y C corresponden, respectivamente, a las cepas 48 (23F), 69 (19F) y 1515/97 (6B). ***, $P < 0.001$.

4.1.4. Efecto de otros antibióticos sobre el depósito de C3b

Una vez demostrado que los antibióticos β -lactámicos favorecen la inmunidad mediada por el sistema del complemento en presencia de anticuerpos, se analizó si este efecto ocurre también en presencia de otras familias de antibióticos, como las fluoroquinolonas o los macrólidos. Los experimentos de C3b se realizaron mediante incubación de las diferentes cepas en presencia o ausencia de concentraciones subinhibitorias de LVX, ERY y CDN utilizando suero hiperinmune como fuente de complemento, o bien, PBS o suero inactivado por calor (como controles negativos). En presencia de concentraciones por debajo de la CMI de LVX, los niveles de unión de C3b fueron similares a los obtenidos con el suero hiperinmune sin antibiótico para los tres aislados, indicando que este antibiótico no mejora el reconocimiento de *S. pneumoniae* por el sistema del complemento (Fig. 39). Por el contrario, el depósito de C3b se incrementó de forma significativa cuando la bacteria se incubó en presencia de suero y concentraciones subinhibitorias de ERY o CDN, en comparación con la opsonización con el suero sólo, mostrando que tanto ERY como CDN activan la inmunidad mediada por el sistema del complemento.

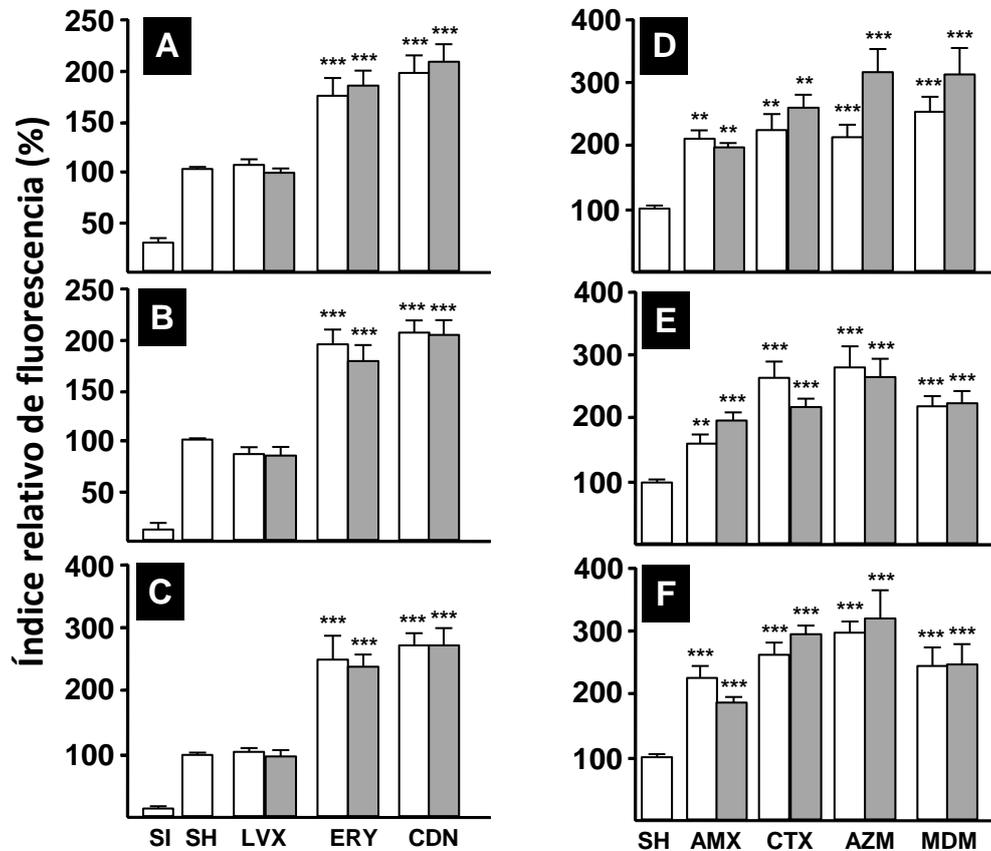


Fig. 39. Depósito de C3b en diferentes cepas de *S. pneumoniae*. Se utilizó suero de ratón inactivado por calor (SI), suero hiperinmune (SH), o SH en ausencia o presencia de 0.25 × CMI (barras grises) o 0.5 × CMI (barras blancas) de los antibióticos indicados. Los paneles A-D, B-E, y C-F corresponden, respectivamente, a las cepas 48 (23F), 69 (19F) y 1515/97 (6B). **P, <0.01, ***P, <0.001). ***P, < 0.001 para todas las cepas y ***P, < 0.001 para la comparación global en la unión de C3b.

Con objeto de ampliar nuestros resultados a otros macrólidos y β-lactámicos, se exploró el depósito de C3b en la superficie bacteriana en presencia de azitromicina (AZT) y midecamicina (MDM), como miembros del grupo de macrólidos, y amoxicili-

na (AMX) y cefotaxima (CTX) como representantes de la familia de los β -lactámicos (Fig. 39). La presencia de concentraciones subinhibitorias de los antibióticos mencionados incrementó significativamente el depósito de C3b en comparación con las bacterias incubadas sólo en suero hiperinmune ($P < 0.001$ test ANOVA una vía), confirmando que estos dos grupos de antibióticos inducen la activación del sistema del complemento en presencia de anticuerpos específicos.

Para tratar de dilucidar el mecanismo molecular mediante el cual tiene lugar la activación del complemento, se construyeron mutantes en la principal autolisina de neumococo, la proteína LytA, en las cepas de serotipo 19F y 6B, ya que diversos intentos para conseguir el mutante en la cepa de serotipo 23F no tuvieron éxito. Como cabía esperar, los mutantes *lytA* mostraron un patrón de susceptibilidad antibiótica idéntico al de las correspondientes cepas clínicas para todos los antibióticos evaluados. Los mutantes *lytA* mostraron un patrón similar de depósito de C3b en su superficie, independientemente de la adición de ERY o CDN, sugiriendo que la maquinaria autolítica de la bacteria está involucrada en el efecto cooperativo entre la inmunidad del complemento y estos antibióticos (Fig. 40).

4.1.5. CDN estimula la opsonofagocitosis de *S. pneumoniae* en presencia de anticuerpos específicos

CDN es una cefalosporina de tercera generación que se administra por vía oral y que posee una marcada actividad antimicrobiana tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y, en particular, contra aislados de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina/amoxicilina (Fenoll *et al.*, 2008). Para determinar si concentraciones subinhibitorias de CDN podrían producir un incremento en la fagocitosis de *S. pneumoniae* mediada por neutrófilos en presencia de anticuerpos anticapsulares específicos se utilizó, en una primera serie de experimentos, la línea celular humana HL-60 diferenciada a granulocitos y, a continuación, neutrófilos obtenidos de sangre periférica de ratón. La incubación de las cepas de neumococo resistentes con diferentes concentraciones subinhibitorias de CDN, CRO o HBSS (en vez de suero), no incrementó la fagocitosis en comparación con las muestras control incubadas solamente en HBSS, confirmando que la exposición a los antibióticos en ausencia de componentes del suero no afecta a las tasas de fagocitosis (Fig. 41). Por otro lado, como era de esperar, la incubación de las diferentes cepas con el correspondiente suero hiperinmune, incrementó la fagocitosis de *S. pneumoniae* para las

tres cepas. Con diferentes grados de significación estadística, el tratamiento combinado de suero y CDN incrementó la fagocitosis de neumococo por los granulocitos (Fig. 41A, B, y D) mientras que, en las mismas condiciones, la CRO no mostró tal efecto (Fig. 41C). Se obtuvieron resultados similares cuando se ensayó la fagocitosis utilizando neutrófilos de ratón (Fig. 41E–H). En resumen, se puede afirmar que los resultados obtenidos sugieren que la eficacia de la fagocitosis mediada por fagocitos profesionales, se ve incrementada en presencia de anticuerpos específicos y concentraciones subinhibitorias de CDN.

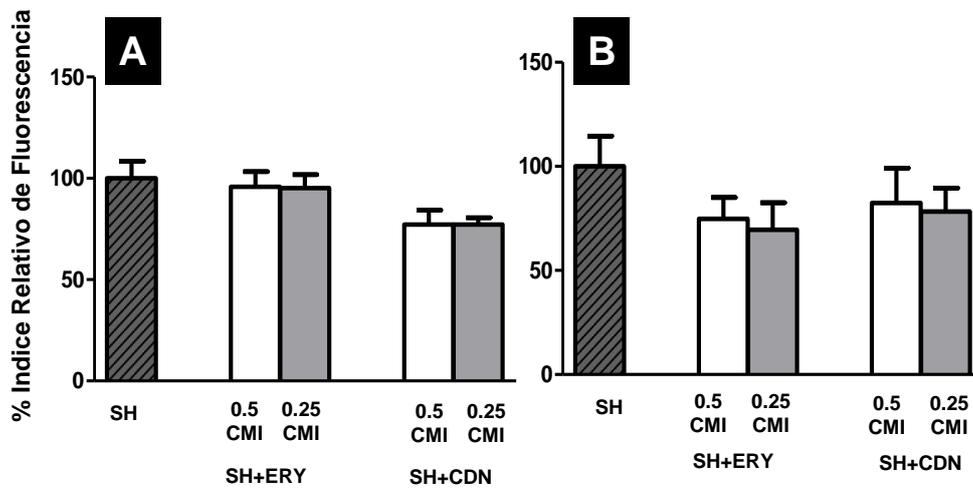


Fig. 40. Depósito de C3b en la superficie de cepas mutantes *lytA*. Se usó suero hiperinmune (SH) y en presencia o ausencia de 0.5 y 0.25 veces la CMI de ERY o CDN. (A) Depósito de C3b en la superficie de la cepa 69 *lytA* (serotipo 19F). (B) Depósito de C3b en la superficie de la cepa 1515/97 *lytA* (serotipo 6B).

4.1.6. Actividad de CDN en ratones preinmunizados

Los experimentos de supervivencia se realizaron utilizando un modelo de sepsis en ratón. Las dosis letales mínimas (que producían un 100% de mortalidad a lo largo

de los 7 días del período de estudio) fueron 3.6×10^7 para la cepa de serotipo 6B, 1.7×10^7 para la cepa de serotipo 19F y 4.8×10^6 para la cepa de serotipo 23F.

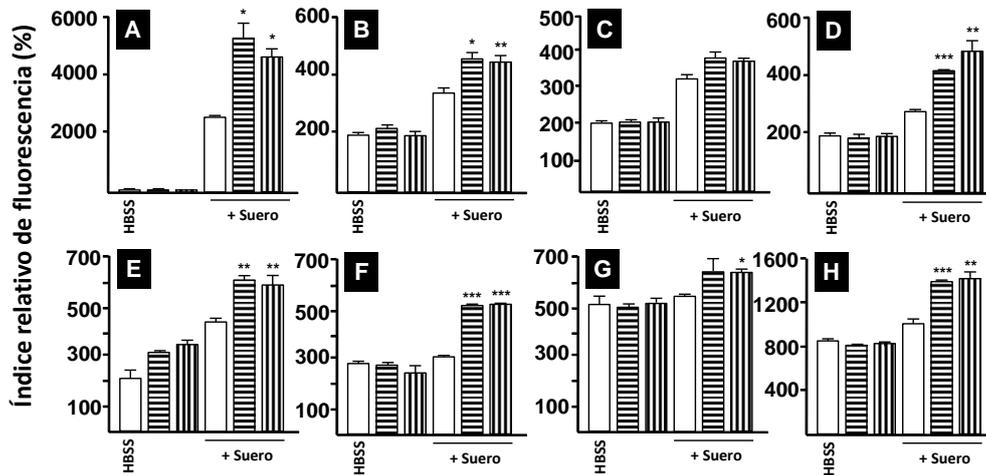


Fig. 41. Incremento de la opsonofagocitosis de neumococo en presencia de CDN. Se utilizaron la línea celular HL-60 diferenciada a granulocitos (A–D) o neutrófilos de ratón (E–H). En los experimentos en que se utilizó suero hiperinmune, éste se usó en una dilución 1/10. Se emplearon las estirpes 48, (A, E), 69 (B, C, F, G) y 1515/97 (D, H). En los paneles C y G se usó CRO en lugar de CDN. La concentración de antibióticos utilizada fue $0.5 \times$ CMI (barras con rayas horizontales) y $0.25 \times$ CMI (barras con rayas verticales). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

Para evaluar la capacidad protectora del suero se inmunizaron grupos de cinco ratones con diferentes diluciones de dicho suero 1 h antes de la infección con la dosis letal de la correspondiente bacteria y se analizó la supervivencia de los animales durante un periodo de 7 días. Los grupos de ratones inmunizados con diluciones 1/4 del correspondiente suero y que no recibieron tratamiento antibiótico, mostraron una supervivencia nula tras la infección con la cepa de serotipo 6B y 23F y del 20% en los inoculados con la cepa de serotipo 19F (Tabla 8). La inmunización con diluciones 1/2 del suero aumentó los porcentajes de supervivencia alcanzando valores

del 40% frente a las cepas de serotipo 6B y 19F y del 20% para la cepa de serotipo 23F. Basándonos en estos resultados, la primera dilución de suero que mostraba un 100% de mortalidad (o la máxima mortalidad observada) se consideró como la dilución no protectora del suero. Éstas fueron de 1/4 para las cepas de serotipo 6B y 19F y 1/2 para la cepa de serotipo 23F (Tabla 8).

La protección conferida por los antibióticos se investigó infectando lotes de animales con la dosis letal de la cepa correspondiente (ver más arriba) y, 1 h más tarde, se inició el tratamiento antibiótico administrándose, por vía subcutánea, un total de 6 dosis a intervalos de 8 h. El tratamiento con 50 mg kg⁻¹ de CDN en animales infectados con la cepa 1515/97 o 100 mg kg⁻¹ en los infectados con la cepa de serotipo 19F produjo un 100% de supervivencia, mientras que en los infectados con la cepa 48, la dosis de 100 mg kg⁻¹ produjo una supervivencia máxima de sólo el 60% (Tabla 8). La mayor dosis de CDN que mostró la tasa de supervivencia más baja se denominó dosis no protectora de antibiótico: 12.5 mg kg⁻¹ para la cepa de serotipo 6B (0% de supervivencia) y 50 mg kg⁻¹ para las cepas de serotipo 19F (0% de supervivencia) y 23F, respectivamente (20% de supervivencia). En el caso de CRO y la cepa de serotipo 19F (CMI = 4 mg ml⁻¹), se obtuvo el 100% de supervivencia con la dosis de 25 mg kg⁻¹ mientras que, con 6.25 mg kg⁻¹, todos los animales murieron (Tabla 8).

Para investigar la posible existencia de un incremento en la supervivencia mediado por el tratamiento antibiótico en presencia de anticuerpos específicos, se inmunizaron grupos de animales con diluciones no protectoras del correspondiente suero inmune y, 1 h más tarde, se infectaron con la dosis letal mínima de la cepa correspondiente. Al igual que en los experimentos anteriormente descritos y comenzando 1 h después de la infección, un grupo de animales fue tratado, a intervalos de 8 h, con la dosis no protectora de los diferentes antibióticos. Las tasas de supervivencia de los ratones infectados con la cepa de serotipo 6B aumentaron desde el 0%, obtenido en los animales que sólo recibieron la dosis no protectora de suero o CDN, hasta alcanzar el 90% en los animales que recibieron la combinación (Tabla 8). Con respecto a los animales infectados con la cepa de serotipo 19F, el rango de supervivencia pasó del 0% (con CDN sólo) y 10% (con suero), al 60% obtenido con la terapia combinada. Por su parte, en los animales infectados con la cepa de serotipo 23F, la supervivencia pasó del 10%, con las dosis no protectoras de CDN o suero, respectivamente, a un 60% con la combinación de ambos. En el caso de la

cepa de serotipo 19F y utilizando CRO como tratamiento antibiótico, la supervivencia aumentó del 0% al 20% en la terapia combinada.

Tabla 8. Farmacodinamia de CDN y CRO y su eficacia en un modelo de sepsis neumocócica

Grupo experimental	CDN						CRO	
	Cepa 1515/97 (6B)		Cepa 48 (23F)		Cepa 69 (19F)		%T _{CDM}	Supervivencia (%) ^a
	%T _{CDM}	Supervivencia (%) ^a	%T _{CDM}	Supervivencia (%) ^a	%T _{CDM}	Supervivencia (%) ^a		
SH ^b								
Control	-	0	-	0	-	0	-	0
SH 1/4	-	0	-	0	-	20	-	20
SH 1/2	-	40	-	20	-	40	-	40
Antibiótico (mg kg ⁻¹) ^c								
Control	-	0	-	0	-	0	-	0
6.25	21.6	0	15.8	ND ^e	18.7	0	20.6	0
12.5	22.8	0	17.2	20	19.9	20	26.9	80
25	31.7	60	20.8	20	24.5	0	41.1	100
50	34.6	100	22.4	20	26.8	0	45.6	100
100	45.9	ND	27.3	60	36.1	100	ND ^e	ND ^e
SH + antibiótico								
Control	-	0	-	0	-	0	-	0
Antibiótico ^c	22.8	0	22.4	10	26.8	0	20.6	0
SH ^d	-	0	-	10	-	10	-	0
SH ^d + antibiótico ^c	22.8	90	22.4	60	26.8	60	20.6	20

^a La supervivencia se determinó a los 7 días postinfección.

^b SH, suero hiperinmune.

^c Para CDN, 12.5 o 50 mg kg⁻¹ para la cepa 1515/97 y las cepas 48 o 69, respectivamente; para CRO, 6.25 mg kg⁻¹. Los antibióticos se inyectaron empezando 1 h después de la infección y cada 8 h por vía subcutánea y durante 48 h (seis dosis en total).

^d Dilución 1/4 o 1/2 para las cepas 1515/97 o 69 y la cepa 48, respectivamente.

^e ND, no determinado.

Utilizando el test de Kaplan-Meier se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las tasas de supervivencia obtenidas con la estrategia combinada en comparación a las dosis no protectoras de suero hiperinmune o CDN para las tres cepas ensayadas [1515/97 ($P < 0.0001$), 69 ($P < 0.01$) y 48 ($P < 0.05$)], pero no para CRO y la cepa 69 ($P = 0.1$). Estos resultados confirmaron que la eficacia del tratamiento con CDN frente a cepas resistentes de *S. pneumoniae* fue significativamente más alta en presencia de anticuerpos específicos antineumocócicos.

Para analizar más en detalle el impacto del tratamiento antimicrobiano con los antibióticos β-lactámicos CDN y CRO en ratones inmunizados, esto es, conteniendo anticuerpos específicos, se inocularon grupos de 5 ratones por vía ip con una única

dosis no protectora de suero o con PBS, antes de la infección con la dosis letal mínima de cada aislado clínico de *S. pneumoniae*. El tratamiento antibiótico (o placebo, en su caso) se administró cada 8 h durante las primeras 24 h por vía subcutánea comenzando 1 h después de la infección. Se utilizaron las dosis más altas de CDN y CRO que producían la tasa de supervivencia más baja (Tabla 8). Las dosis de CDN administradas fueron 12.5 mg kg⁻¹ para la cepa 6B y 50 mg kg⁻¹ para las cepas 23F y 19F, mientras que la dosis de CRO administrada a los grupos de animales infectados con la cepa 19F, utilizada a modo de comparación, fue 6.25 mg kg⁻¹. Los resultados mostraron que la eficiencia del tratamiento con antibióticos β-lactámicos contra neumococos resistentes es mayor en presencia de anticuerpos específicos, a pesar de que los niveles de anticuerpos no sean protectores (Fig. 42).

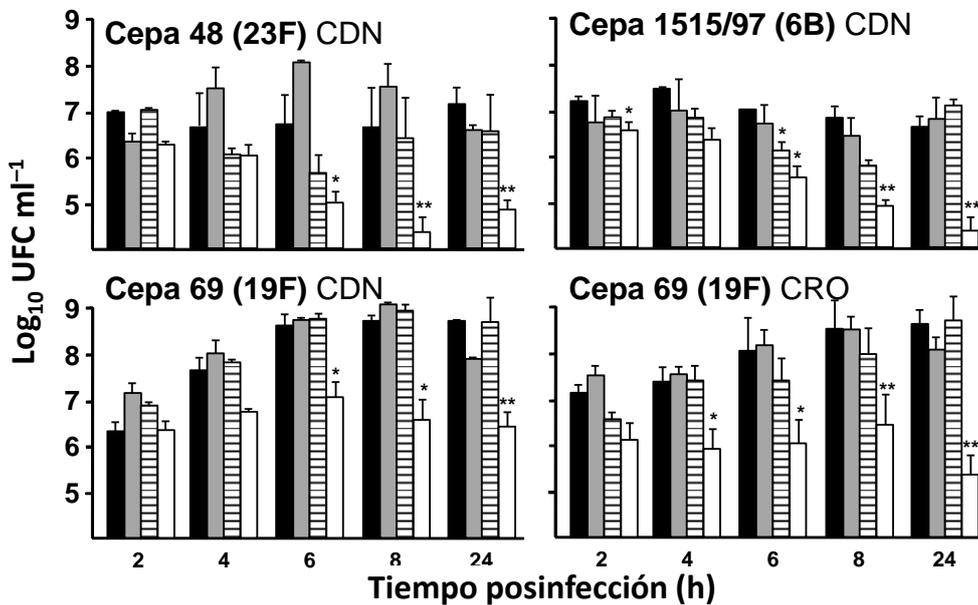
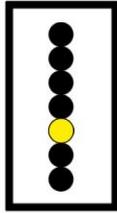


Fig. 42. Reducción de la bacteriemia en ratones preinmunizados y tratados con antibióticos β-lactámicos. Los animales fueron tratados con el correspondiente suero hiperinmune (barras rayadas y barras blancas) o con placebo (PBS) (barras negras y barras grises). Una hora después, los animales fueron infectados con una dosis letal de cada una de las cepas de neumococo indicadas y, 1 h más tarde, se instauró el tratamiento antibiótico (barras grises y barras blancas) o se administró PBS en lugar de antibiótico (barras negras y barras rayadas).

Para establecer la terapia más conveniente en cada caso y evitar o, al menos, reducir la posibilidad de desarrollo de resistencias a los agentes antimicrobianos, es fundamental conocer los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de los diferentes antibióticos (Esposito y Principi, 2013). Los parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos para CDN y CRO en nuestras condiciones experimentales fueron calculados con las concentraciones medidas en el suero de ratón. Los rangos de unión a proteína en el suero de ratón fueron de 86.9% para CDN y 91.9% para CRO. Uno de los parámetros farmacodinámicos más importantes que se correlacionan con la eficacia antibacteriana de, entre otros, los antibióticos β -lactámicos en modelos animales de infección es el tiempo en que la concentración del antibiótico en el suero se mantiene por encima de la CMI (Craig, 1998). Normalmente, este parámetro se expresa como el porcentaje acumulado de ese tiempo, en un periodo de 24 h ($\%T_{CMI}$) (Mouton *et al.*, 2005). Si este u otros parámetros tienen que ver únicamente con la fracción libre del antibiótico (la no unida a proteínas séricas), se añade el prefijo *f* (por *free*) como en, por ejemplo, $f\%T_{CMI}$. En animales no inmunizados, los valores de $\%T_{CMI} \cong 35$ para CDN ($f\%T_{CMI} \cong 19$) se asociaron con un 100% de supervivencia [50 mg kg⁻¹ de CDN para la cepa de serotipo 6B (CMI = 1 mg ml⁻¹) y 100 mg kg⁻¹ para la cepa de serotipo 19F (CMI = 2 mg ml⁻¹) (Tabla 8). Los valores más bajos de la CMI se asociaron con un 60% de supervivencia con las dosis de 25 mg kg⁻¹ de CDN para la cepa de serotipo 6B y 100 mg kg⁻¹ para la cepa de serotipo 23F (CMI = 4 mg ml⁻¹). Cuando los valores de $\%T_{CMI}$ para CDN fueron <26.8%, la supervivencia fue del 20% (12.5 mg kg⁻¹ para la cepa de serotipo 6B o 50 mg kg⁻¹ para las cepas de serotipos 19F y 23F) (Tabla 8). En el caso de CRO y la cepa de serotipo 19F (CMI= 4 mg ml⁻¹), se obtuvo un 100% de supervivencia con $\%T_{CMI} \cong 41$, correspondiente a la administración de 25 mg kg⁻¹, mientras que el 0% de supervivencia se obtuvo con un $\%T_{CMI} \cong 20.6$ %, que corresponde a una dosis de 6.25 mg kg⁻¹. Estos resultados son concordantes con los publicados para varios antibióticos β -lactámicos en estudios previos (para una revisión, véase Craig, 1998).



V. DISCUSIÓN

1. BASES MOLECULARES DE LA PATOGÉNESIS MEDIADA POR LAS PROTEÍNAS LYTB Y LYTC DE NEUMOCOCO

S. pneumoniae es uno de los patógenos más importantes responsables de enfermedades graves asociadas con una alta mortalidad y morbilidad en todo el mundo (O'Brien *et al.*, 2009). Aunque la cápsula neumocócica es esencial para la virulencia participando en la evasión del reconocimiento por parte del sistema del complemento así como de la fagocitosis (Hyams *et al.*, 2010), existen evidencias que sugieren que otros componentes bacterianos son importantes en las distintas etapas de la patogénesis (Kadioglu *et al.*, 2008).

La identificación y análisis funcional de los productos génicos que participan en colonización, inflamación e invasión es una herramienta clave para entender la interacción hospedador-patógeno y proporciona conocimientos esenciales que podrían ser usados en la lucha frente a este patógeno con el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas o estrategias basadas en vacunas. El peptidoglicano es el componente mayoritario de la pared celular bacteriana y puede ser modificado por la actividad de las hidrolasas de pared celular (Vollmer *et al.*, 2008). Estas enzimas desempeñan un papel en patogénesis no del todo conocido en la actualidad aunque existen evidencias de que son importantes (López y García, 2004). El peptidoglicano es uno de los principales patrones moleculares de reconocimiento asociados a patógenos y funciona como una diana para el sistema inmune. Las modificaciones de este componente pueden ser usadas por las bacterias patógenas para evadir la inmunidad innata del hospedador (Dziarski y Gupta, 2005; Mengin-Lecreux y Lemaître, 2005; Dziarski *et al.*, 2012). Las hidrolasas de la pared celular son requeridas para la unión inicial del microorganismo a superficies hidrofóbicas y contribuyen a la patogénesis bacteriana y a la virulencia incrementando la supervivencia en la circulación sistémica y, por tanto, promoviendo la diseminación de diferentes bacterias patógenas (Heilman *et al.*, 1997; Cabanes *et al.*, 2004; Wang y Lin, 2008; Jung *et al.*, 2009).

En este estudio, se construyeron mutantes sencillos en las proteínas LytB y LytC, así como un doble mutante *lytB lytC*, para investigar la función de tales proteínas en la patogénesis de neumococo, explorando su posible implicación en diferentes manifestaciones como el estado de portador, la enfermedad invasiva, así como en la evasión de los mecanismos de defensa del hospedador. En cuanto al estado de

portador los estudios de esta tesis doctoral demuestran que tanto LytB como LytC son proteínas neumocócicas de superficie involucradas en la unión a células de nasofaringe humanas, con un marcado efecto de LytC a 30°C, que es la temperatura fisiológica del tracto respiratorio superior humano y que coincide con la temperatura óptima de esta enzima (García *et al.*, 1999b). Resultados previos de Gosink y cols. (2000) habían mostrado que la pérdida de LytC originaba la pérdida de, aproximadamente, un 30% de la capacidad de adherencia de *S. pneumoniae* a células D562 a 30°C, mientras que no se observó ningún efecto a 37°C. Existen, no obstante, dos puntos que diferencian nuestro trabajo de éste: a) aquellos autores emplearon un derivado de la cepa TIGR4 no capsulado y marcado previamente con isotiocianato de fluoresceína; b) además, utilizaron una metodología un tanto diferente de la nuestra ya que emplearon glutaraldehído para fijar las células antes de contar y, además, las bacterias adheridas se contaron utilizando un microscopio. Es muy posible que, debido a estas diferencias, se pudo haber introducido algún tipo de sesgo en los resultados obtenidos por Gosink *et al.* (2000). Además, en nuestro estudio se utilizó un doble mutante *lytB lytC* —construido tanto en una cepa de serotipo 2 (D39) como en otra de serotipo 4 (TIGR4) — para evaluar el papel de ambas proteínas en la adhesión a células de nasofaringe. Nuestros resultados demuestran por primera vez que la unión de *S. pneumoniae* a células de nasofaringe humanas se reduce muy notablemente en ausencia de LytB y LytC, mostrando un máximo de inhibición a 30°C (Fig. 9).

El papel de la glucosaminidasa LytB y de la lisozima LytC se investigó, además, utilizando un modelo de colonización en ratón que incluía la inoculación de una dosis suficientemente elevada de bacterias (10^7 UFC) para que el inóculo resultara en la colonización así como en la infección de las mucosas adyacentes pero sin llegar a producir bacteriemia (van Ginkel *et al.*, 2003). Los niveles bacterianos en la nasofaringe se mantuvieron entre 10^4 y 10^5 UFC ml⁻¹ a lo largo de los 7 días de estudio (Fig. 14). Estos resultados confirmaron que este modelo de colonización nasofaríngea es similar a la portación de neumococo que tiene lugar en la especie humana (McCool y Weiser, 2004). Nuestros resultados mostraron que LytB y LytC son importantes enzimas líticas de pared que están implicadas en la unión inicial de neumococo a la nasofaringe (Fig. 14). No obstante, otras proteínas también participan en este proceso ya que, en ausencia de estas proteínas, también se producía la colonización, aunque en un porcentaje menor, y se pudo confirmar que la combinación de ambas enzimas es necesaria, siquiera parcialmente, para un proceso de coloni-

zación efectivo del tracto respiratorio superior. Con estas premisas, resulta evidente que las intervenciones (farmacológicas o de otro tipo) que impidan o dificulten la acción de LytB, LytC, o ambas, podrían constituir una estrategia muy atractiva para, al menos, dificultar el establecimiento del estado de portador. A este respecto, resulta interesante destacar el hecho de que tanto LytB como LytC constituyen también un requerimiento necesario para el desarrollo de biofilmes de neumococo en un modelo *in vitro* (Moscoso *et al.*, 2006; Domenech *et al.*, 2012, 2013).

Tras el proceso de adherencia y la colonización asintomática, la bacteria tiene que enfrentarse —y superar con éxito— los mecanismos implicados en el reconocimiento y eliminación del microorganismo para poder alcanzar el espacio alveolar y/o la circulación sistémica dando lugar a la ENI. El sistema del complemento es un importante componente del sistema inmune del hospedador que participa en el reconocimiento y la fagocitosis de los patógenos (Walport, 2001a). Ya se ha mencionado en la presente Memoria la implicación de diferentes proteínas de *S. pneumoniae* en la inhibición de la inmunidad del complemento y de la fagocitosis (Yuste *et al.*, 2005; Quin *et al.*, 2007a; Dalia *et al.*, 2010). Nuestros resultados han evidenciado que la pérdida de LytC, pero no de LytB, incrementa el depósito de C3b tanto a 30°C como a 37°C, demostrando que LytC permite reducir el depósito de este importante factor del sistema del complemento en la superficie de la bacteria (Fig. 10). Esta es la primera evidencia que demuestra la implicación de la lisozima LytC en la evasión del complemento por parte de *S. pneumoniae*. Además, la pérdida simultánea de LytB y LytC se asoció con un marcado incremento en el depósito de C3b sobre la superficie bacteriana confirmando que esta combinación resulta muy efectiva a la hora de eludir la inmunidad del complemento.

Para analizar la interacción de LytB y LytC con células fagocitarias, se utilizaron dos líneas celulares distintas representativas de la fagocitosis de neumococo (Romero-Steiner *et al.*, 1997; Stegenga *et al.*, 2009). Los mutantes sencillos en dichas proteínas mostraron una mayor fagocitosis por macrófagos alveolares y neutrófilos mientras que, la fagocitosis del doble mutante *lytB lytC*, se vio sensiblemente mejorada en comparación con la de los mutantes sencillos. Estos resultados no parecen atribuibles a las variaciones en la separación celular que existen dentro de las cepas de estudio, es decir, en la formación de cadenas o agregados bacterianos, ya que se ha demostrado que el número medio de neumococos por fagocito es el mismo, independientemente de si los neumococos forman cadenas o no (Austrian, 1953). Además, si el encadenamiento característico de los mutantes *lytB* (García *et*

al., 199a) estuviera contribuyendo a un mejor reconocimiento por parte de las células fagocitarias cabría esperar un efecto en el depósito de C3b por parte de LytB. Nuestros resultados indican que las hidrolasas del peptidoglicano LytB y LytC son proteínas importantes implicadas en la resistencia a la fagocitosis y, además, queda demostrado que la presencia de ambas es altamente efectiva a la hora de facilitar a la bacteria la evasión de la fagocitosis. Existe una asociación clara entre esta resistencia a la fagocitosis y la diseminación de la bacteria ya que las cepas más resistentes a la eliminación por neutrófilos poseen ventajas para persistir en la nasofaringe (Weinberger *et al.*, 2009). Nuestro estudio apoya esta hipótesis y sugiere que uno de los principales mecanismos de virulencia de LytB y LytC en neumococo podría radicar en colaborar para eludir el reconocimiento por parte de las células fagocíticas profesionales dentro del tracto respiratorio superior, permitiendo de esta forma a la bacteria colonizar la nasofaringe de un modo eficaz. Por todos estos motivos, LytB y LytC pueden ser proteínas candidatas para su uso en futuras vacunas. Alternativa o complementariamente a ello, estas proteínas podrían constituir dianas farmacológicas para el desarrollo de nuevas moléculas que ayuden a reducir el estado de portador mediante el incremento de la capacidad de los sistemas de defensa del hospedador para reconocer a *S. pneumoniae* en la nasofaringe.

De manera análoga a las observaciones originales de Tomasz y Wask (1975), la adición de las CBPs purificadas a cultivos de los correspondientes mutantes conllevó la “corrección fenotípica” de tales neumococos mutantes (López *et al.*, 2004). En este sentido, la adición de proteína LytB, LytC, o ambas a los mutantes sencillos y al doble mutante, respectivamente, restauró los niveles de C3b unidos a los obtenidos con la cepa silvestre (Fig. 10). De igual modo, dichas peptidoglicán-hidrolasas incrementaban fuertemente la resistencia a la fagocitosis hasta niveles similares a los encontrados en la cepa silvestre (Fig. 13) indicando que los fenotipos observados eran debidos a la carencia de LytB/LytC en los mutantes más que a otras diferencias genéticas de las cepas (v. g., mutaciones secundarias desconocidas).

Existen algunas evidencias previas que sugieren que los factores de virulencia necesarios para la ENI pueden ser asimismo importantes en la colonización de la nasofaringe, ya que la mayoría de los genes requeridos para el desarrollo de la enfermedad invasiva fueron también necesarios para el establecimiento del estado de portador (Hava y Camilli, 2002; Hava *et al.*, 2013). Por esta razón, el papel de LytB y LytC en la neumonía neumocócica y en la sepsis se investigó usando un modelo

murino. Históricamente, la determinación *in vivo* de la contribución de un determinado gen a la virulencia se ha basado en el uso de la prueba de la dosis letal 50 (DL₅₀) que se define como el número de bacterias necesarias para matar al 50% de los animales infectados. Es una medida útil de virulencia, pero presenta algunas limitaciones importantes. Los IC son una medida alternativa que utiliza infecciones mixtas para determinar el grado de atenuación en virulencia causada por una mutación dada. En ellos se inoculan cantidades equivalentes de dos cepas (cepa silvestre y mutante) en un animal hospedador y las bacterias son recuperadas de los órganos objeto a un tiempo determinado mediante recuentos en placa. Normalmente, las cepas se diferencian utilizando marcadores de resistencia a antibióticos. El IC es una medida más sensible de la atenuación en virulencia que la DL₅₀ ya que refleja directamente el número de bacterias y no el de animales supervivientes, lo cual permite distinguir aquellos mutantes cuyo grado de atenuación no es suficiente como para detectarse mediante la DL₅₀. Además, al ensayar los niveles de virulencia del mutante frente a la cepa silvestre dentro de un mismo animal, la variación animal-animal se reduce notablemente. Otra ventaja del IC con respecto a la DL₅₀ reside en que éste se calcula a partir del número de animales supervivientes mientras que, el IC, se obtiene teniendo en cuenta el número de bacterias antes y después de la infección. Por todo esto, los IC constituyen una indicación más exacta de la virulencia usando un menor número de animales. Todos estos factores han hecho del análisis mediante IC un método cada vez más popular para evaluar la atenuación en virulencia (Hensel *et al.*, 1998).

Mediante el uso de IC se determinó que la falta de LytB no tenía efecto apreciable alguno en la virulencia indicando que, LytB por sí misma, no participa en el establecimiento de la neumonía ni en la diseminación sistémica (Figs. 15 y 16). Estos resultados están de acuerdo con los publicados por otros autores que utilizaron un modelo de sepsis en ratón (Kharat y Tomasz, 2006). Sin embargo, la virulencia del mutante *lytC* sí se mostró como atenuada en ambos modelos de infección con una capacidad nula de diseminarse desde el pulmón a la sangre, confirmando, en consecuencia, que LytC es un importante factor de virulencia de *S. pneumoniae*. El doble mutante *lytB lytC* demostró estar más atenuado en virulencia, incluso, que los correspondientes mutantes sencillos. Esto confirma que la presencia de LytB y LytC en la bacteria permite un establecimiento muy efectivo de la neumonía neumocócica y la sepsis, e indica que ambas proteínas facilitan la diseminación de la bacteria desde los pulmones a la circulación sistémica. Estos resultados están de acuerdo

con los de otros autores que propusieron que los distintos factores de virulencia de neumococo actúan en conjunto incrementando la virulencia de la bacteria y reforzando la idea de que se requieren varios componentes bacterianos para producir de forma eficiente enfermedad invasiva (Orihuela *et al.*, 2004; Yuste *et al.*, 2005; Quin *et al.*, 2007a).

LytB y LytC son proteínas expuestas en la superficie que desempeñan un importante papel en fases esenciales de la patogénesis de neumococo como son la colonización nasofaríngea, la neumonía y la sepsis. Nuestros datos sugieren que las hidrolasas de pared celular de neumococo son proteínas esenciales para la unión de la bacteria a la nasofaringe y la neumonía neumocócica y sepsis mediante la evasión de la inmunidad del complemento y la fagocitosis.

2. PAPEL DE LA AUTOLISINA LYTA Y LA NEUMOLISINA PLY EN LA EVASIÓN DE LA DEFENSA INMUNE

Como ya se comentó en la Introducción de esta Memoria (véase Apto. 1.4.2.4), Ply es una proteína peculiar dentro de la familia de las CDCs porque, aunque se sabe que actúa fuera de la célula bacteriana, no contiene PS u otra señal conocida que permita su transporte (Walker *et al.*, 1987). Hasta hace relativamente poco tiempo, el modelo propuesto era que Ply era liberada al medio extracelular únicamente tras la autólisis causada por la NAM-amidasa-LytA y, por ello, lo que se ha asumido históricamente es que LytA participa en la virulencia de la bacteria sólo (o, al menos, mayoritariamente) como un factor necesario para la liberación de Ply (Paton *et al.*, 1993). En este sentido, se ha descrito que Ply confiere a neumococo una capacidad reducida de ser opsonizado (mediante la activación de la vía clásica del complemento) mientras que, como ya queda dicho, el efecto de LytA en la evasión del complemento se ha achacado a la liberación de Ply y no a una implicación directa de LytA en dicho proceso (Paton *et al.*, 1984; Alcantara *et al.*, 2001; Kadioglu *et al.*, 2008). Contradiendo este modelo, Balachandran y cols. (2001) observaron que Ply es liberada en el sobrenadante de cultivos *in vitro* en algunos mutantes *lytA* y, más recientemente, se ha identificado Ply en la pared celular de neumococos de diferentes serotipos en fases de crecimiento donde, se supone, que la autólisis característica de esta especie no está teniendo lugar (Price y Camilli, 2009; Price *et al.*, 2012).

En la presente Tesis doctoral se demuestra que LytA desempeña verdaderamente un papel fundamental en la evasión del complemento que es independiente de la liberación de Ply. En cuanto a Ply, nuestros resultados (Fig. 17D) confirmaron otros previos (Yuste *et al.*, 2005) que indicaban que esta proteína impide la activación de la vía clásica del complemento por un mecanismo que es mediado por C1q. Por otra parte, el elevado depósito de C3b observado en los dobles mutantes *lytA ply* (cepas P129 y P130) indicó que la presencia de ambas proteínas (y no sólo de Ply) en *S. pneumoniae* confiere una gran ventaja para resistir el ataque por el sistema del complemento (Fig. 17). Por otra parte, la pérdida de LytA da lugar a un mayor reconocimiento por CRP y C1q así como un mayor depósito de C3b que en el caso del mutante en Ply (Fig. 20).

Nuestros resultados demuestran que LytA usa un mecanismo refinado que incluye una reducida activación de ambas vías, clásica y alternativa, confirmando que esta proteína contribuye a la evasión de la inmunidad del complemento de un modo independiente de Ply. El reclutamiento de reguladores negativos como C4BP y fH es un mecanismo utilizado por diferentes patógenos para eludir la inmunidad del complemento (Serruto *et al.*, 2010). Aunque PspC es una de las proteínas de *S. pneumoniae* mejor conocidas que está involucrada en la unión de fH y C4BP, existen otras proteínas de neumococo que podrían contribuir a esta interacción (Dieudonné-Vatran *et al.*, 2009; Ogunniyi *et al.*, 2009; Yuste *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2012). En esta Tesis se describe, por vez primera, a LytA como una nueva proteína de neumococo que contribuye al reclutamiento de C4BP (Fig. 21) y fH (Fig. 22) reduciendo por tanto la inmunidad mediada por el complemento frente a neumococo. La falta de unión a C4BP y fH que ocurre en ausencia de LytA y PspC confirma que estas dos proteínas desempeñan un papel mayoritario en la interacción con estos reguladores negativos. Mediante la unión de altos niveles de fH, los serotipos invasivos de *S. pneumoniae* son relativamente resistentes a la fagocitosis mediada por neutrófilos dependiente del complemento, lo que les confiere una mayor capacidad para causar septicemia (Hyams *et al.*, 2013).

Para las bacterias Gram-positivas, la opsonización por C3b es un prerrequisito para su destrucción por las células fagocíticas y, por ello, *S. pneumoniae* ha desarrollado una serie de mecanismos para evadir la opsonofagocitosis. Estos mecanismos de evasión ya han sido descritos en otros microorganismos relacionados como en los estreptococos del grupo A (*S. pyogenes*), donde la proteína de superficie M inhibe la unión del receptor del complemento al componente C3b (Weis *et al.*,

1985). En *S. pneumoniae*, se ha observado recientemente que la endopeptidasa PepO, mediante su unión a plasminógeno, es capaz de hidrolizar C3b de forma indirecta, mediante un mecanismo dependiente de plasmina (Agarwal *et al.*, 2013). Además, mediante la utilización de sueros que carecen de los componentes C1q y factor B del complemento, impidiendo la activación de la vía clásica y alternativa respectivamente, se ha podido confirmar en esta Tesis que es necesario que las dos vías estén funcionando para que se dé el efecto aditivo que observamos en presencia de sueros procedentes de voluntarios sanos (Fig. 17).

El mecanismo por el cual la NAM-amidasa LytA produce una disminución en los niveles de C3b depositados en la superficie celular fue estudiado mediante la adición de proteína purificada al mutante *lytA* (Fig. 19A). En estas condiciones, los niveles de C3b se redujeron a niveles similares a los obtenidos en la cepa silvestre sólo cuando se añadió proteína LytA enzimáticamente activa. Además, la autolisina LytA fue capaz de degradar C3b cuando ambas proteínas se incubaron conjuntamente *in vitro* (Fig. 19B). Estos resultados confirmaron, de manera directa, que LytA es responsable directa de la resistencia de neumococo a la inmunidad del complemento. El fenómeno de degradación de C3 se ha observado en todos los aislados clínicos de neumococo y se asocia a una proteína de neumococo desconocida (Angel *et al.*, 1994). Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que LytA es la responsable del proceso de degradación de C3b unido a la superficie bacteriana de un modo similar a lo que ocurre con las proteínas SpeB de *S. pyogenes* (Kuo *et al.*, 2008; Terao *et al.*, 2008) o EspP de *E. coli* (Orth *et al.*, 2010).

La posible repercusión fisiológica de la evasión del complemento por parte de LytA y Ply se estudió mediante experimentos de fagocitosis. Los macrófagos alveolares son una de las primeras líneas de defensa del sistema inmune del hospedador frente a patógenos invasores en el pulmón. La ausencia de Ply y LytA se asoció con un mejor reconocimiento de la bacteria por macrófagos alveolares (Fig. 23) confirmando que estas dos proteínas desempeñan un papel crítico reduciendo el reconocimiento de *S. pneumoniae* por estas células. El nivel de fagocitosis fue mayor en los mutantes sencillos y mucho más elevado aún para el doble mutante demostrando que Ply y LytA son proteínas de neumococo que contribuyen de una manera muy eficiente a la resistencia de la fagocitosis por macrófagos alveolares. Estos hallazgos están en consonancia con evidencias previas que sugieren que diferentes proteínas de *S. pneumoniae* (incluyendo distintas hidrolasas de pared celular) están involucradas en una inhibición sinérgica

de la inmunidad del complemento y la fagocitosis (Yuste *et al.*, 2005; Martner *et al.*, 2009; Dalia *et al.*, 2010; Dalia y Weiser, 2011). Los resultados obtenidos demostraron, además, que la muerte de neumococo dentro de los macrófagos se incrementó a lo largo del tiempo para los diferentes mutantes en comparación con la cepa silvestre lo cual reafirma que Ply y LytA confieren resistencia frente a la fagocitosis. La maduración de los fagosomas que contienen *S. pneumoniae* se confirmó mediante la observación de la bacteria en distintos compartimentos subcelulares como endosomas tempranos y fagosomas tardíos (Fig. 24) demostrando así que la bacteria estaba siendo efectivamente eliminada mediante la ruta fagolisosomal de los macrófagos (Stuart y Ezekowitz, 2005).

Los neutrófilos también son células clave en el control de la diseminación de microorganismos en la circulación sistémica incluyendo *S. pneumoniae* (Standish y Weiser, 2009; Summers *et al.*, 2010). En nuestros estudios con células diferenciadas a neutrófilos se confirmó que Ply y LytA son importantes proteínas de neumococo involucradas en evasión de la fagocitosis demostrándose, además, que la presencia de ambas proteínas es altamente efectiva en la resistencia de la fagocitosis de neumococo mediada por neutrófilos (Fig. 25). Estos experimentos confirmaron una correlación clara entre la evasión del complemento y la resistencia a la fagocitosis, ya que el doble mutante fue reconocido de un modo muy eficiente por el componente C3b y, en consecuencia, el nivel de fagocitosis de esta cepa se vió claramente favorecido.

En la superficie de las células fagocíticas se exponen una gran variedad de receptores que son capaces de interactuar con ciertos ligandos expresados por diferentes patógenos microbianos, promoviendo su internalización y, finalmente, su eliminación (Arredouani *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006; Stuart y Ezekowitz, 2005; Underhill y Goodridge, 2012). Sin embargo, ciertos patógenos intracelulares han desarrollado estrategias muy sofisticadas utilizando diferentes receptores específicos del hospedador para su propio beneficio y con el fin de entrar en las células eucariotas donde poder replicarse (Rosenberger y Finlay, 2003; Cossart y Sansonetti, 2004). Este es el caso, como ya se comentó anteriormente, de los patógenos intracelulares obligados *A. phagocytophilum*, *Ehrlichia* y el enterovirus 71 que acceden al interior celular mediante su unión al receptor PSGL-1 causando, respectivamente, anaplasmosis granulocítica, ehrlichiosis granulocítica y la enfermedad de manos, pies y boca (Herron *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2007; Nishimura *et al.*, 2009; Rikihisa, 2011). Las células HL-60 expresan los mismos receptores fago-

cíticos que los neutrófilos de sangre periférica, incluyendo CR1, CR3, Fc γ y PSGL-1 entre otros, que son utilizados para fagocitar a *S. pneumoniae* o para el reconocimiento y entrada de *A. phagocytophilum* (Romero-Steiner *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2003; Troese y Carlyon, 2009). Los resultados de esta Tesis doctoral demuestran un nuevo papel para el receptor PSGL-1 confirmando, por primera vez, que éste es un receptor funcional que contribuye a la fagocitosis de neumococo. La utilización de anticuerpos anti-PSGL-1 inhibe la extravasación y bloquean el receptor en leucocitos humanos y de ratón *in vivo* (Borges *et al.*, 1997; Norman *et al.*, 1995). En todas las cepas investigadas, se observó co-localización con el receptor PSGL-1 (Fig. 30). Los mayores niveles de fagocitosis se observaron en ausencia de las proteínas Ply y LytA obteniendo niveles similares a los de la cepa silvestre cuando se bloqueó el receptor PSGL-1 (Fig. 29), lo que confirma que estas dos proteínas contribuyen a la evasión del reconocimiento de *S. pneumoniae* por dicho receptor. Como ya se comentó, la expresión de PSGL-1 es regulada por un proceso complejo en el que participa la tirosina quinasa SYK (Cao *et al.*, 2010; Hogg, *et al.*, 2011) de modo que ciertos microorganismos incluyendo *A. phagocytophilum* y el VIH requieren SYK para la infección celular (Thomas y Fikrig, 2007; Reneer *et al.*, 2008). La fagocitosis de neumococo vía PSGL-1 se vió drásticamente reducida cuando se inactivó SYK con piceatannol (Fig. 32) demostrando que la fagocitosis de *S. pneumoniae* mediada por PSGL-1 es dependiente de su activación. Los hallazgos obtenidos demostraron que PSGL-1 es un receptor de leucocitos involucrado en el reconocimiento y fagocitosis del patógeno humano *S. pneumoniae*. Como consecuencia, en un modelo de neumonía y sepsis utilizando ratones deficientes en PSGL-1 se observó que la bacteria se replicaba descontroladamente en la sangre, permitiendo un rápido desarrollo de la infección. Estas observaciones demostraron, por primera vez, que PSGL-1 juega un papel crucial como mecanismo de defensa inmune frente a la ENI. La pérdida de PSGL-1 se ha asociado con una marcada susceptibilidad a patógenos intracelulares como *Salmonella typhimurium* o *Citrobacter rodentium*, que está asociada a la producción de niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias después de la infección intestinal (Kum *et al.*, 2009, 2010). En nuestro caso, tras la infección neumocócica, los niveles de citoquinas pro-inflamatorias fueron indistinguibles en el BALF de ratones PSGL-1^{-/-} o en el de ratones silvestres, aunque fueron ligeramente mayores en la sangre de los ratones PSGL-1^{-/-} (Tabla 6), confirmando que el principal efecto de PSGL-1 en sangre es

inducir la fagocitosis y eliminar a *S. pneumoniae* de la circulación sistémica en el caso de ENI.

Hasta el comienzo de esta Tesis, las claves de la contribución de LytA a la patogénesis de neumococo permanecían desconocidas, en su mayor parte. La atenuación en virulencia observada en los mutantes *lytA* se atribuía a la falta de lisis de la pared celular y la imposibilidad de la consiguiente liberación de Ply, pero no a una contribución directa de la proteína en la interacción patógeno-hospedador. Se creía que la razón de esta menor virulencia se debía, además de a su falta de actividad autolítica para liberar la Ply intracelular, a la no producción de componentes proinflamatorios de la pared celular como algunas fracciones del peptidoglicano, los TAs o ambos (Berry et al., 1989; Canvin et al., 1995; Sato *et al.*, 1996; Berry y Patton, 2000; Orihuela et al., 2004; Hirst et al., 2008). Nuestros resultados van más allá al demostrar que LytA contribuye de forma directa a la patogénesis del microorganismo por un mecanismo independiente de Ply. Como ya queda dicho, los estudios de virulencia realizados por los autores antes mencionados indicaron que los mutantes sencillos (*lytA* o *ply*) se encuentran atenuados en modelos animales de infección, indicando que tanto Ply como LytA contribuyen a la patogénesis de neumococo. En el presente trabajo, hemos mostrado cómo el doble mutante *lytA ply* (cepa P141) posee un grado muy marcado de atenuación en virulencia, tanto en el modelo de sepsis como en el de neumonía, con niveles de bacteria en sangre muy bajos, lo que demuestra que, en ausencia de ambas proteínas, la capacidad de neumococo para multiplicarse en sangre está muy mermada (Figs. 27 y 28). Los hallazgos obtenidos en la presente Tesis confirman que Ply y LytA son proteínas de neumococo que juegan un papel crítico en el establecimiento de la ENI y que, en consecuencia, podrían ser utilizadas en un futuro como posibles candidatas a una vacuna universal proteica con el fin de reducir y, eventualmente, bloquear la capacidad infectiva de neumococo.

3. NUEVAS PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS

La búsqueda de tratamientos efectivos en la lucha contra las enfermedades infecciosas ha sido, desde hace muchos años, uno de los principales retos de la humanidad. Hasta que no se descubrieron los antibióticos se disponía de pocas armas para combatir los agentes infecciosos. En la última década del siglo XIX, se utilizaron terapias basadas en anticuerpos para tratar las infecciones (Casadevall 1996) y,

en los años veinte del pasado siglo, la sueroterapia se utilizó frente a numerosas infecciones bacterianas, incluyendo las producidas por *S. pneumoniae* (Casadevall y Scharff, 1995). Estos tratamientos consiguieron reducir, en un 50%, la mortalidad ocasionada por este patógeno (Casadevall y Scharff, 1994). Sin embargo, cuando apareció la quimioterapia antibiótica, a mediados de la década de los treinta del pasado siglo, se abandonó la sueroterapia y se sustituyó por el tratamiento antibiótico, debido a su mayor efectividad y menor toxicidad.

Las medidas preventivas y terapéuticas frente a la infección producida por *S. pneumoniae* han modificado las resistencias de este patógeno. La PCV7, que incluía los CPS de los principales serotipos responsables de ENI y no susceptibles a PEN, ERY o ambos, se licenció a principios del presente siglo para la inmunización de la población infantil. El uso generalizado de esta vacuna conllevó una disminución drástica de la incidencia de la enfermedad neumocócica causada por los serotipos incluidos en ella y redujo la prevalencia creciente de los serotipos de neumococo no susceptibles a PEN. Como consecuencia de ello, la PCV7 produjo un marcado efecto en la epidemiología de los aislados clínicos obtenidos de adultos los cuales, indirectamente, también se beneficiaron de la vacunación de la población infantil (Fenoll *et al.*, 2009). Las cepas utilizadas en el presente estudio (las denominadas como 48, 69 y 1515/9; Tabla 2) se seleccionaron no sólo por poseer los serotipos incluidos en las vacunas PCV7 y PCV13 sino, también, por sus altos niveles de resistencia a diferentes antimicrobianos entre los que destacaban los β -lactámicos y los macrólidos (Soriano *et al.*, 2008). De hecho, un estudio reciente ha identificado a los aislados clínicos de los serotipos 6B, 19F y 23F como importantes factores de riesgo en la mortalidad producida por la ENI (Luján *et al.*, 2010).

Los antibióticos interactúan con la bacteria de un modo más complejo cuando ejercen su actividad *in vivo* que cuando se ensayan en condiciones *in vitro* debido a la presencia de las proteínas del suero. Mientras que las inmunoglobulinas y el complemento pueden mejorar la actividad de los antibióticos β -lactámicos, la albúmina puede limitarla (Schmidt *et al.*, 2008; Beer *et al.*, 2009; Burian *et al.*, 2011). En la presente Tesis doctoral se ha estudiado la eficacia terapéutica proporcionada por la combinación de determinados antibióticos en presencia de anticuerpos específicos y, además, se ha analizado la capacidad del sistema inmune para modificar los parámetros farmacodinámicos y farmacocinéticos predictivos de eficacia para los antibióticos CDN y CRO. Para estudiar la influencia de las proteínas séricas sobre la actividad de CDN Sevillano y cols. (2008) realizaron una simulación farmacodi-

námica en la que se analizó la actividad del antibiótico a lo largo de 24 h después de la administración oral de 400 mg de CDN. Se midió la unión a proteínas y se observó que, a concentraciones fisiológicas y bajo condiciones de unión a proteínas similares a las encontradas en humanos, el CDN ejercía actividad antibacteriana frente a distintos aislados clínicos que exhibían CMI de 0.25 mg ml^{-1} y 0.5 mg ml^{-1} , sugiriendo que la presencia de albúmina no debilita la actividad antineumocócica de esta cefalosporina.

Los modelos animales han sido muy útiles en el entendimiento de la relación farmacocinética/farmacodinamia para estimar qué parámetro farmacodinámico es el mejor predictor de la eficacia antibiótica. En el caso de *S. pneumoniae* son necesarios, además, modelos animales ya que, como se ha comentado en esta Tesis, los anticuerpos frente al CPS suelen estar presentes en el organismo antes de la infección debido al estado de portador y a determinadas medidas preventivas, como la vacunación. Estudios previos con un modelo de sepsis neumocócica en los que se utilizó la misma cepa de serotipo 6B utilizada en esta Tesis, habían mostrado que las dosis protectoras de AMX y CTX eran, aproximadamente, ocho veces más bajas en presencia (utilizando inmunización pasiva) que en ausencia de anticuerpos específicos anti-CPS (Casal *et al.*, 2002; Yuste *et al.*, 2002). Además, mientras que, en ausencia de anticuerpos, se obtuvieron unos valores de $\%T_{\text{CMI}} \cong 30$ —un valor próximo al descrito previamente para los antibióticos β -lactámicos en otros trabajos (Craig, 1998)—, en los animales sometidos a sueroterapia se determinaron valores muy inferiores (de 3 y 5 para AMX y CTX, respectivamente). Desgraciadamente, la existencia de este sinergismo desde el punto de vista farmacocinético/farmacodinámico, no fue ensayado con otros antibióticos, β -lactámicos o no, ni con aislados clínicos de neumococo de otros serotipos distintos. Hay que resaltar que, en cualquier caso, el beneficio del sinergismo mediado por anticuerpos, no consistiría en una reducción de las dosis de antibiótico sino en conseguir una mayor eficacia terapéutica tras la administración de las dosis habituales en episodios de ENI producidos por aislados clínicos con una CMI elevada. Los resultados obtenidos en la presente Tesis han confirmado que la inmunización previa de los animales permite disminuir el valor de $\%T_{\text{CMI}}$ para CDN asociado con eficacia terapéutica frente a las tres cepas estudiadas. Mientras que, en los animales inmunizados, un $\%T_{\text{CMI}} \cong 22.8\%$ para CDN se asoció con un 90% de supervivencia para la cepa de serotipo 6B y 60% (con valores de $\%T_{\text{CMI}}$ similares) para las cepas de serotipos 19F y 23F, valores similares de $\%T_{\text{CMI}}$ se asociaron con una supervivencia $<10\%$ en ra-

tones no inmunizados (Tabla 8). En marcado contraste con lo observado para CDN, en el caso de CRO no se observó este sinergismo entre los antibióticos y los anticuerpos específicos. Una posible explicación podría ser que toda la CRO administrado se podría unir a las proteínas del suero bajo las condiciones de un tratamiento combinado, lo que implica que la CRO libre no estaría disponible para estimular la respuesta inmune del hospedador e inducir protección (Granizo *et al.*, 2008; Sevilla *et al.*, 2008).

La fagocitosis es un proceso crítico para el control de la infección frente a patógenos capsulados, como es el caso de neumococo (Brown *et al.*, 1983). En este sentido, los experimentos de fagocitosis mostraron que la colaboración específica de anticuerpos y CDN fue muy superior a la encontrada para CRO frente a la cepa 69 (serotipo 19F) tanto con neutrófilos de sangre periférica como con la línea celular HL-60 (Fig. 41). Independientemente del tipo celular utilizado (neutrófilos de sangre murina o células HL-60), las concentraciones subinhibitorias de CDN estimularon de modo significativo la fagocitosis producida por el suero hiperinmune (diluido 1/10) frente a los tres aislados ensayados. Además de la importancia de los anticuerpos anticapsulares en la inmunidad frente a *S. pneumoniae* en los individuos vacunados, el complemento y los anticuerpos frente a antígenos no capsulares también son importantes (Lipsitch *et al.*, 2005). En nuestro estudio se utilizó suero hiperinmune obtenido de ratones inmunizados con células de *S. pneumoniae* muertas por calor. Nuestros resultados confirmaron que la fagocitosis mediada por células profesionales incrementaba en presencia de concentraciones subinhibitorias de CDN y anticuerpos específicos frente a *S. pneumoniae* (con un mayor efecto en los experimentos en los que se utilizaron neutrófilos frescos de ratón).

El objetivo de cualquier tratamiento antibiótico es la disminución rápida de la carga bacteriana. Recientemente, la carga bacteriana se ha asociado con la severidad de la infección en pacientes con neumonía neumocócica (Rello *et al.*, 2009). Estudios previos con modelos animales habían mostrado el efecto que tienen anticuerpos específicos o antibióticos β -lactámicos (amoxicilina y cefotaxima) en el perfil bacteriémico y su relación con mortalidad (Yuste *et al.*, 2002a, b). En nuestro estudio el perfil bacteriémico también se asoció con mortalidad, investigando la predicción de mortalidad mediante la relación de los recuentos bacterianos en sangre a las 8 horas después de la primera dosis administrada. A las 8 h, antes de la segunda administración, cuando todos los animales estaban aún vivos, el grupo de animales muertos el día 7 mostraba una alta carga bacteriana, mientras que en el gru-

po de animales que sobrevivían el día 7 los recuentos bacterianos fueron bajos (Fig. 42). Estos hallazgos subrayan la importancia que, para la eficacia terapéutica, tiene una rápida actividad antibacteriana responsable de una reducción temprana de la carga bacteriana.

En ausencia de tratamiento antibiótico, el alcance de la infección depende completamente del balance de las interacciones entre los factores de virulencia bacterianos y los mecanismos de defensa del hospedador. La eliminación de neumococo de la circulación sistémica depende de la opsonización por el sistema de complemento y su posterior fagocitosis (Bogaert *et al.*, 2004; van der Poll y Opal, 2009). Las cepas de neumococo PEN^R sintetizan un peptidoglicano que contiene más péptidos hidrofóbicos (que permiten los entrecruzamientos Ala-Ala o Ala-Ser) que las cepas susceptibles a PEN (García-Bustos *et al.*, 1988). El muramil dipéptido liberado de las paredes celulares bacterianas de los neumococos tratados con PEN, es un potente estimulador de la respuesta inmune (para una revisión reciente, véase Salem *et al.*, 2012). El bloqueo en la liberación de este componente en las cepas PEN^R podría ser el responsable de la reducida inmunogenicidad de los serotipos capsulares que normalmente se asocian con resistencia a PEN (van Dam *et al.*, 1990; Jansen y Snippe, 2004). En este sentido, resulta interesante señalar que el suero hiperinmune frente al serotipo 6B (estirpe 1515/97) (que presentaba la CMI más baja a CDN y CRO dentro de las tres cepas utilizadas en el estudio; Tabla 7) es el que contenía los niveles más altos de anticuerpos de las tres cepas estudiadas.

Los antibióticos β -lactámicos ejercen su actividad bactericida por una acción directa sobre el microorganismo. Sin embargo, la ENI está asociada con altos niveles de mortalidad y morbilidad a pesar de una terapia antibiótica adecuada (Austrian y Gold, 1964; van Dam *et al.*, 1990). Esta falta de eficacia antibiótica es muy común y especialmente evidente en pacientes inmunodeprimidos, sugiriendo que la recuperación de estos pacientes depende de la acción conjunta de los antibióticos y los mecanismos de defensa del hospedador. La emergencia de cepas altamente resistentes a los antibióticos podría poner en riesgo el éxito de la terapia antibiótica (Soriano *et al.*, 2008). La alteración de las estructuras superficiales bacterianas causadas por determinados antibióticos, podría dar lugar a una mayor exposición de epítopos antigénicos profundos que normalmente están poco accesibles o, incluso, escondidos. Esta mayor exposición podría promover la opsonización por parte de diferentes componentes de defensa del hospedador, como las proteínas de fase aguda,

mejorando así el reconocimiento de los patógenos por parte de los fagocitos. En este sentido, el uso de cefalosporinas se ha asociado con un incremento en la actividad bactericida del suero frente a patógenos como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Darveau y Cunningham, 1990; Jung *et al.*, 1998), mientras que el tratamiento con ERY parece producir pequeños puntos de ruptura en la pared celular, causando una rotura de la envuelta en *Legionella pneumophila* (Elliott y Rodgers. 1985; Rodgers *et al.*, 1990). Además, se ha demostrado que el macrólido AZM, en concentraciones inferiores a la CMI, desestabiliza la membrana externa incrementando la permeabilidad y produciendo la muerte de *P. aeruginosa* (Imamura *et al.*, 2005). De un modo alternativo, los antibióticos podrían reducir la expresión de los factores de virulencia involucrados en la inhibición de la activación del complemento. De hecho, un reciente estudio ha confirmado que ciertos antibióticos, en concentraciones subinhibitorias, modifican la expresión de genes de virulencia de *S. aureus* (Subrt *et al.*, 2011). En relación a los anticuerpos específicos, se ha demostrado que éstos pueden interferir con el crecimiento y metabolismo de diferentes microorganismos, sugiriendo un nuevo mecanismo para la inmunidad mediada por anticuerpos (Casadevall y Pirofski, 2004). Recientemente, se ha observado, además, que los anticuerpos unidos a *Cryptococcus neoformans* alteran la expresión génica y el metabolismo, incrementando la susceptibilidad del patógeno a determinadas drogas antifúngicas (McClelland *et al.*, 2010).

Las pentraxinas CRP y SAP son las principales proteínas de fase aguda en la especie humana y el ratón, respectivamente. Los niveles de CRP aumentan durante la infección neumocócica, demostrando así la importancia de esta proteína de fase aguda como molécula centinela (Almirall *et al.*, 2004). Uno de las funciones más importantes desempeñadas por CRP y SAP en la defensa del hospedador frente a neumococo es la opsonización de los microorganismos y la posterior inducción de la fagocitosis vía receptores Fc γ (Mold *et al.*, 2001; Thomas-Rudolph *et al.*, 2007; Yuste *et al.*, 2007). Los resultados de nuestro estudio (Fig. 35) demuestran que el reconocimiento de *S. pneumoniae* por CRP y SAP se optimiza cuando la bacteria es opsonizada con suero en presencia de concentraciones subinhibitorias de CDN o CRO, sugiriendo que estos antibióticos permiten a dichas pentraxinas reconocer a *S. pneumoniae* de un modo más eficaz. Estos resultados apoyan los experimentos realizados en presencia de antibióticos β -lactámicos y anticuerpos específicos ya mencionados más arriba, en los que se detectó una mayor fagocitosis de la bacteria cuando se opsonizó con suero que contenía anticuerpos específicos frente a neu-

mococo y concentraciones subinhibitorias de CDN (Fig. 41). En relación a la pentraxina 3 también se ha demostrado que es muy efectiva en combinación con drogas antimicóticas frente a infecciones producidas por *Aspergillus fumigatus*, estimulando la actividad antifúngica de los fagocitos (Gaziano *et al.*, 2004).

El daño producido en la superficie del patógeno por los fármacos antimicrobianos podría permitir que ciertos componentes de la envuelta celular se encuentren más accesibles para ser reconocidos por los componentes del complemento y los anticuerpos. La exposición de cepas de *Klebsiella pneumoniae* a suero y antibióticos β -lactámicos incrementa los niveles de C3b en la superficie de la bacteria (Williams, 1987). Como ya se ha comentado en esta Memoria, la vía clásica del complemento es activada por el primer componente (C1q), el cual reconoce directamente ciertos ligandos en la superficie de la bacteria o puede ser activado por proteínas de fase aguda e inmunoglobulinas específicas. Nuestros resultados demuestran que el depósito de C1q en la superficie de la bacteria se incrementa en presencia de CDN y CRO (Fig. 36), confirmando que las alteraciones causadas por estos antibióticos mejoran la inmunidad mediada por el sistema del complemento frente a *S. pneumoniae* a través de un mecanismo dependiente de la activación de la vía clásica. Una vez que la cascada del complemento está activada y tras una serie de reacciones enzimáticas, se forma el componente principal C3b (Walport, 2001). El depósito de C3b en la superficie bacteriana fue significativamente mayor cuando la bacteria se opsonizó con suero y concentraciones subinhibitorias de CDN y CRO (Figs. 37–39). Tomando todos estos datos conjuntamente, se puede afirmar que nuestros resultados confirman que el aumento en el reconocimiento de *S. pneumoniae* por CRP y C1q mediado por CDN y CRO tiene consecuencias funcionales en términos de opsonización por el componente C3b y explica por qué la fagocitosis de neumococo se incrementa en presencia de suero y concentraciones subinhibitorias de antibióticos β -lactámicos.

El tratamiento precoz con antibióticos es esencial para prevenir la morbilidad severa y la mortalidad, ya que el retraso en la aplicación del tratamiento da lugar a un aumento en la mortalidad. Este problema empeora cuando los patógenos presentan altos niveles de resistencia antibiótica. Ante esta posibilidad, el tratamiento con CDN o CRO representa una nueva estrategia para reducir el riesgo de fallo terapéutico tras el tratamiento antibiótico en aquellas personas que han sido previamente vacunadas frente a *S. pneumoniae*, mediante una mejora en la eficiencia de la respuesta inmune mediada por el complemento. Además de los antibióticos β -

lactámicos, en esta Memoria se probaron otros fármacos representativos de los distintos grupos de antibióticos confirmando que el depósito de C3b sobre la superficie de la bacteria, se incrementaba en presencia de anticuerpos específicos y concentraciones subinhibitorias de AMX y CTX, o macrólidos como ERY, AZM y MDM (Fig. 39). Estos resultados apoyan datos de otros autores en los que, utilizando AMX o CTX, se observó que la inmunización frente a *S. pneumoniae* incrementaba la eficacia del tratamiento con antibióticos β -lactámicos al aumentar la capacidad del sistema inmune del hospedador para reconocer y eliminar, de un modo eficaz, aislados resistentes de neumococo (Casal *et al.*, 2002; Yuste *et al.*, 2001, 2002b). Sin embargo, las concentraciones inferiores a la CMI de LVX no afectaron a la opsonización por C3b en ninguna de las cepas investigadas (Fig. 39), explicando así por qué el tratamiento con dosis subterapéuticas de LVX en ratones previamente inmunizados frente a cepas encapsuladas de *S. pneumoniae* de serotipo 6B, no incrementaba el nivel de supervivencia (Tarragó *et al.*, 2005).

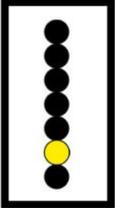
La modulación de la respuesta inmune del hospedador por macrólidos ha sido estudiada en otras bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Labro, 2000). La actividad antimicrobiana de los macrólidos se incrementa frente a cepas resistentes de *E. coli* y *S. aureus* cuando los aislados clínicos son expuestos a concentraciones subinhibitorias de ERY o AZM en presencia de suero humano. Nuestros resultados confirman, en el caso de neumococo, que la exposición de cepas resistentes a concentraciones subinhibitorias de diferentes macrólidos incrementa el depósito de C3b en la superficie de la bacteria (Fig. 39). Además, la pérdida de la principal enzima autolítica de neumococo, la NAM-amidasa LytA, eliminó cualquier incremento en la unión de C3b mediado por la exposición a β -lactámicos o macrólidos (Fig. 40), indicando que la actividad de LytA podría desempeñar un papel importante en el reconocimiento por el sistema del complemento.

Otro mecanismo alternativo responsable del mayor depósito de C3b en *S. pneumoniae* mediado por antimicrobianos, podría ser el debido a un incremento en la longitud de las cadenas formadas por la bacteria después de la exposición a ciertos antibióticos, como ERY, que pueden facilitar el reconocimiento de la bacteria por el sistema del complemento (Dalia y Weiser, 2011). Las imágenes de microscopía de contraste de fases después de la incubación bacteriana con concentraciones subinhibitorias de diferentes antibióticos mostraron, no obstante, que la morfología de las tres cepas resistentes de neumococo expuestas a β -lactámicos permanecía mayoritariamente inalterada, mostrando la típica forma de diplococo o cadenas cortas. En

presencia de ERY, existía un encadenamiento ocasional en la cepa 48 (de serotipo 23F), mientras que las otras dos cepas mantenían la morfología habitual. La incubación con AZM tampoco modificó la longitud de las cadenas en ninguna de las cepas investigadas sugiriendo que, en nuestras condiciones experimentales, la formación de cadenas desempeñaba, en todo caso, sólo un papel minoritario en el incremento del depósito de C3b.

Los macrólidos inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas actuando sobre la subunidad ribosómica 50S. Estos antibióticos, a concentraciones subinhibitorias, inhiben la producción de Ply, que ya se ha definido como un importante factor de virulencia de *S. pneumoniae* involucrado en la evasión de C3b. Además, se ha demostrado que macrólidos, como ERY, AZM, o claritromicina (pero no la roxitromicina), inhiben de un modo significativo la síntesis de Ply y PspA (Fukuda *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2007; Yasuda *et al.*, 2007). Esto es relevante, tanto desde el punto de vista antimicrobiano como inmunológico, porque la combinación de ambas proteínas tiene un efecto aditivo y es muy efectiva en la inhibición de la activación del complemento (Yuste *et al.*, 2005).

Nuestros resultados demuestran que ERY y CDN mejoran el reconocimiento de las cepas de neumococo por el componente C3b en presencia de una inmunidad adquirida y apoyan la hipótesis de que LytA, la principal autolisina de la bacteria, participa en este proceso. Con este trabajo queda demostrado que, con las actuales estrategias de vacunación que mejoran los niveles de anticuerpos circulantes que estimulan eficazmente la inmunidad del complemento y la fagocitosis, junto con un tratamiento antibiótico con macrólidos o β -lactámicos, se podría conseguir una nueva estrategia para terminar con la posibilidad de obtener fallos terapéuticos en casos de ENI producidos por cepas de neumococo con altos niveles de resistencia antibiótica.

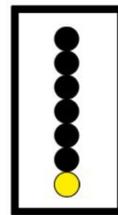


VI. CONCLUSIONES

1. LytC, la lisozima autolítica de neumococo, permite a la bacteria reducir el depósito de C3b en su superficie. Además, la pérdida simultánea de LytC y la glucosaminidasa LytB se asocia con un incremento en el reconocimiento de neumococo por C3b, indicando que ambas proteínas participan en la evasión de la inmunidad del complemento.
2. Además del polisacárido capsular, LytB y LytC están involucradas en la defensa contra la fagocitosis mediada por neutrófilos o macrófagos alveolares.
3. LytB y LytC son importantes proteínas de superficie implicadas en la adhesión de *S. pneumoniae* a las células de la nasofaringe. A 30°C —la temperatura del tracto respiratorio superior humano— ambas proteínas cooperan de manera especialmente importante para facilitar dicha unión y el establecimiento del estado de portador.
4. La pérdida de LytB, por sí sola, no parece suponer un inconveniente relevante para el establecimiento de la neumonía o la diseminación sistémica de neumococo. LytC, sin embargo, es un importante factor de virulencia de *S. pneumoniae*. No obstante, la combinación de ambas proteínas, LytB y LytC, permite un desarrollo acelerado de la neumonía neumocócica y la sepsis.
5. Las autolisina LytA y la neumolisina Ply están implicadas en la evasión de la inmunidad mediada por el complemento gracias a que originan una reducción importante de los niveles de C3b depositados en la superficie de las bacterias. Estas proteínas permiten a neumococo eludir la vía clásica del complemento al causar una reducción apreciable en el depósito de C1q y CRP. Además, LytA es capaz de degradar las moléculas de C3b unidas a la superficie bacteriana. Esta actividad depende de la actividad enzimática de la autolisina.
6. El doble mutante *lytA ply* mostró mayores niveles de C3b unido y fue fagocitado más eficientemente que los mutantes simples, lo que demuestra que ambas proteínas actúan de forma conjunta para eludir los mecanismos de defensa del huésped.

CONCLUSIONES

7. LytA interacciona con los reguladores negativos del complemento, factor H (vía alternativa) y C4BP (vía clásica), incrementando, de este modo, la capacidad de neumococo para eludir la inmunidad del complemento.
8. LytA y Ply participan en la evasión de la fagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares humanos y macrófagos alveolares. La localización de la bacteria durante la fagocitosis por macrófagos alveolares tiene características endosomales.
9. En el caso de los PMNs, la fagocitosis de neumococo está mediada por el receptor PSGL-1 en un mecanismo dependiente de la tirosina quinasa SYK. Además, se ha demostrado que PSGL-1 contribuye a evitar la diseminación sistémica de *S. pneumoniae*.
10. Las mutaciones en LytA y Ply se asociaron con una marcada atenuación en virulencia confirmando que ambas proteínas desempeñan un papel importante en la enfermedad neumocócica.
11. Las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a los antibióticos son más propensas a ser reconocidas por las proteínas de fase aguda CRP y SAP cuando la bacteria ha sido expuesta previamente a antibióticos β -lactámicos. Además, en presencia de anticuerpos específicos, concentraciones subinhibitorias de antibióticos β -lactámicos estimulan la capacidad de C1q para activar tanto la vía clásica como el depósito de C3b en la superficie de la bacteria. Asimismo, la presencia de antibióticos β -lactámicos incrementa la fagocitosis mediada por anticuerpos específicos.
12. En presencia de anticuerpos específicos, el tratamiento *in vivo* con antibióticos β -lactámicos de cepas resistentes de neumococo favorece la eliminación de la bacteria y reduce la sepsis independientemente de si los niveles de anticuerpos son totalmente protectores o no.
13. Los antibióticos macrólidos y β -lactámicos estimulan el reconocimiento de neumococo por el componente C3b en presencia de anticuerpos específicos por un mecanismo que es dependiente de la autolisina LytA de *S. pneumoniae*.



VII. BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, V., Asmat, T.M., Luo, S., Jensch, I., Zipfel, P.F. y Hammerschmidt, S. (2010) Complement regulator factor H mediates a two-step uptake of *Streptococcus pneumoniae* by human cells. *J. Biol. Chem.* **285**: 23486–23495.
- Agarwal, V., Hammerschmidt, S., Malm, S., Bergmann, S., Riesbeck, K. y Blom, A.M. (2012) Enolase of *Streptococcus pneumoniae* binds human complement inhibitor C4b-binding protein and contributes to complement evasion. *J. Immunol.* **189**: 3575–3584.
- Agarwal, V., Kuchipudi, A., Fulde, M., Riesbeck, K., Bergmann, S. y Blom, A.M. (2013) *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. *J. Biol. Chem.* **288**: 6849–6863
- Albiger, B., Dahlberg, S., Henriques-Normark, B. y Normark, S. (2007a) Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *J. Intern. Med.* **261**: 511–528.
- Albiger, B., Dahlberg, S., Sandgren, A., Wartha, F., Beiter, K., Katsuragi, H., *et al.* (2007b) Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell. Microbiol.* **9**: 633–644.
- Alcantara, R.B., Preheim, L.C. y Gentry-Nielsen, M.J. (2001) Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect. Immun.* **69**: 3569–3575.
- Ali, Y.M., Lynch, N.J., Haleem, K.S., Fujita, T., Endo, Y., Hansen, S., *et al.* (2012) The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog.* **8**: e1002793.
- Almirall, J., Bolibar, I., Toran, P., Pera, G., Boquet, X., Balanzó, X. y Sauca, G. (2004) Contribution of C-reactive protein to the diagnosis and assessment of severity of community-acquired pneumonia. *Chest* **125**: 1335–1342.
- Anderson, R., Steel, H.C., Cockran, R., von Gottberg, A., de Gouveia, L., Klugman, K.P., *et al.* (2007) Comparison of the effects of macrolides, amoxicillin, ceftriaxone, doxycycline, tobramycin and fluoroquinolones, on the production of pneumolysin by *Streptococcus pneumoniae* *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**: 1155–1158.
- Andersson, B., Dahmén, J., Frejd, T., Leffler, H., Magnusson, G., Noori, G. y Edén, C.S. (1983) Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **158**: 559–570.
- Anderton, J.M., Rajam, G., Romero-Steiner, S., Summer, S., Kowalczyk, A.P., Carlone, G.M., *et al.* (2007) E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.* **42**: 225–236.
- Andrews, J.M. (1999) Microbiological assays. En *Clinical Antimicrobial Assays*. Reeves, B.S., Wise, R., Andrews, J.M. y White, L.O. (eds). New York, N.Y.: Oxford University Press, pp. 35–44.
- Angel, C.S., Ruzek, M. y Hostetter, M.K. (1994) Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **170**: 600–608.
- Arredouani, M., Yang, Z., Ning, Y., Qin, G., Soininen, R., Tryggvason, K. y Kobzik, L. (2004) The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J. Exp. Med.* **200**: 267–272.
- Asano, M. y Komiyama, K. (2011) Polymeric immunoglobulin receptor. *J. Oral Sci.* **53**: 147–156.
- Atkins, K.L., Burman, J.D., Chamberlain, E.S., Cooper, J.E., Poutrel, B., Bagby, S., *et al.* (2008) S. aureus IgG-binding proteins SpA and Sbi: host specificity and mechanisms of immune complex formation. *Mol. Immunol.* **45**: 1600–1611.
- Attali, C., Durmort, C., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2008a) The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect. Immun.* **76**: 5350–5356.

BIBLIOGRAFÍA

- Attali, C., Frolet, C., Durmort, C., Offant, J., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2008b) *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect. Immun.* **76**: 466–476.
- Austrian, R. (1953) Morphologic variation in pneumococcus. I. An analysis of the bases for morphologic variation in pneumococcus and description of a hitherto undefined morphologic variant. *J. Exp. Med.* **98**: 21–34.
- Austrian, R. (1981a) Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention. *Rev. Infect. Dis.* **3 Suppl**: S1–17.
- Austrian, R. (1981b) Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev. Infect. Dis.* **3**: 183–189.
- Austrian, R. (1986) Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J. Antimicrob. Chemother.* **18 (Suppl. A)**: 35–45.
- Austrian, R. y Gold, J. (1964) Pneumococcal bacteremia with special reference to bacteremic pneumococcal pneumonia. *Ann. Intern. Med.* **60**: 759–776.
- Austrian, R., Douglas, R.M., Schiffman, G., Coetzee, A.M., Koornhof, H.J., Hayden-Smith, S. y Reid, R.D.W. (1976) Prevention of pneumococcal pneumonia by vaccination. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **89**: 184–192.
- Avery, O.T. y Goebel, W.F. (1933) Chemoinmunological studies of the soluble specific substance of pneumococcus. I. The isolation and properties of the acetyl polysaccharide of pneumococcus type 1. *J. Exp. Med.* **58**: 731–755.
- Avery, O.T. y Heidelberger, M. (1925) Immunological relationships of cell constituents of pneumococcus. Second paper. *J. Exp. Med.* **42**: 367–376.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M. y McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med.* **79**: 137–158.
- Babu, M.M., Priya, M.L., Selvan, A.T., Madera, M., Gough, J., Aravind, L. y Sankaran, K. (2006) A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J. Bacteriol.* **188**: 2761–2773.
- Balachandran, P., Hollingshead, S.K., Paton, J.C. y Briles, D.E. (2001) The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J. Bacteriol.* **183**: 3108–3116.
- Balsalobre, L., Hernández-Madrid, A., Llull, D., Martín-Galiano, A.J., García, E., Fenoll, A. y de la Campa, A.G. (2006) Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4163–4171.
- Banerjee, A., van Sorge, N.M., Sheen, T.R., Uchiyama, S., Mitchell, T.J. y Doran, K.S. (2010) Activation of brain endothelium by pneumococcal neuraminidase NanA promotes bacterial internalization. *Cell. Microbiol.* **12**: 1576–1588.
- Barbalat, R., Ewald, S.E., Mouchess, M.L. y Barton, G.M. (2011) Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **29**: 185–214.
- Barnard, J.P. y Stinson, M.W. (1996) The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect. Immun.* **64**: 3853–3857.
- Barocchi, M.A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A., *et al.* (2006) A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 2857–2862.
- Beer, J., Wagner, C.C. y Zeitlinger, M. (2009) Protein binding of antimicrobials: methods for quantification and for investigation of its impact on bacterial killing. *AAPS J.* **11**: 1–12
- Benton, K.A., Paton, J.C. y Briles, D.E. (1997) Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production. *Infect. Immun.* **65**: 1237–1244.

- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G.S. y Hammerschmidt, S. (2001) α -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol. Microbiol.* **40**: 1273–1287.
- Bergmann, S., Rohde, M. y Hammerschmidt, S. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein. *Infect. Immun.* **72**: 2416–2419.
- Bergmann, S. y Hammerschmidt, S. (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* **152**: 295–303.
- Bernardo-García, N., Bartual, S.G., Fulde, M., Bergmann, S. y Hermoso, J.A. (2011) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of phosphoglycerate kinase from *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **67**: 1285–1289.
- Berry, A.M. y Paton, J.C. (2000) Additive attenuation of virulence of *Streptococcus pneumoniae* by mutation of the genes encoding pneumolysin and other putative pneumococcal virulence proteins. *Infect. Immun.* **68**: 133–140.
- Berry, A.M., Lock, R.A., Hansman, D. y Paton, J.C. (1989) Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**: 2324–2330.
- Bestebroer, J., Aerts, P.C., Rooijackers, S.H.M., Pandey, M.K., Köhl, J., van Strijp, J.A.G. y de Haas, C.J.C. (2010) Functional basis for complement evasion by staphylococcal superantigen-like 7. *Cell. Microbiol.* **12**: 1506–1516.
- Beuzón, C.R. y Holden, D.W. (2001) Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions in vivo. *Microbes Infect.* **3**: 1345–1352.
- Bhatty, M., Pruett, S.B., Swiatlo, E. y Nanduri, B. (2011) Alcohol abuse and *Streptococcus pneumoniae* infections: consideration of virulence factors and impaired immune responses. *Alcohol* **45**: 523–539.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513–1523.
- Blom, A.M., Kask, L. y Dahlbäck, B. (2003) CCP1–4 of the C4b-binding protein α -chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b. *Mol. Immunol.* **39**: 547–556.
- Blom, A.M., Hallström, T. y Riesbeck, K. (2009) Complement evasion strategies of pathogens—Acquisition of inhibitors and beyond. *Mol. Immunol.* **46**: 2808–2817.
- Bogaert, D., de Groot, R. y Hermans, P.W.M. (2004) *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect. Dis.* **4**: 144–154.
- Bologa, M., Kamtchoua, T., Hopfer, R., Sheng, X., Hicks, B., Bixler, G., *et al.* (2012) Safety and immunogenicity of pneumococcal protein vaccine candidates: monovalent choline-binding protein A (PcpA) vaccine and bivalent PcpA–pneumococcal histidine triad protein D vaccine. *Vaccine* **30**: 7461–7468.
- Boone, T.J. y Tyrrell, G.J. (2012) Identification of the actin and plasminogen binding regions of group B streptococcal phosphoglycerate kinase. *J. Biol. Chem.* **287**: 29035–29044.
- Borges, E., Eytner, R., Moll, T., Steegmaier, M., Campbell, M.A., Ley, K., *et al.* (1997) The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood* **90**: 1934–1942.
- Botelho, R.J. y Grinstein, S. (2011) Phagocytosis. *Curr. Biol.* **21**: R533–R538.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Branger, J., Knapp, S., Weijer, S., Leemans, J.C., Pater, J.M., Speelman, P., *et al.* (2004) Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. *Infect. Immun.* **72**: 788–794.
- Bratcher, P.E., Park, I.H., Hollingshead, S.K. y Nahm, M.H. (2009) Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogroup 6. *Microbiology* **155**: 576–583.

BIBLIOGRAFÍA

- Bratcher, P.E., Kim, K.-H., Kang, J.H., Hong, J.Y. y Nahm, M.H. (2010) Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiology* **156**: 555–560.
- Braun, J.S., Sublett, J.E., Freyer, D., Mitchell, T.J., Cleveland, J.L., Tuomanen, E.I. y Weber, J.R. (2002) Pneumococcal pneumolysin and H₂O₂ mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J. Clin. Invest.* **109**: 19–27.
- Brenciani, A., Bacciaglia, A., Vecchi, M., Vitali, L.A., Varaldo, P.E. y Giovanetti, E. (2007) Genetic elements carrying *erm(B)* in *Streptococcus pyogenes* and association with *tet(M)* tetracycline resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1209–1216.
- Brezski, R.J., Vafa, O., Petrone, D., Tam, S.H., Powers, G., Ryan, M.H., et al. (2009) Tumor-associated and microbial proteases compromise host IgG effector functions by a single cleavage proximal to the hinge. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**: 17864–17869.
- Brezski, R.J. y Jordan, R.E. (2010) Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases. An evasion tactic against host immunity? *mAbs* **2**: 212–220.
- Briles, D.E., Crain, M.J., Gray, B.M., Forman, C. y Yother, J. (1992) Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **60**: 111–116.
- Briles, D.E., Hollingshead, S.K., Swiatlo, E., Brooks-Walter, A., Szalai, A., Virolainen, A., et al. (1997) PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb. Drug Resist.* **3**: 401–408.
- Briles, D.E., Tart, R.C., Swiatlo, E., Dillard, J.P., Smith, P., Benton, K.A., et al. (1998) Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA). *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 645–657.
- Brooks-Walter, A., Briles, D.E. y Hollingshead, S.K. (1999) The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect. Immun.* **67**: 6533–6542.
- Brouwer, M.C., de Gans, J., Heckenberg, S.G.B., Zwinderman, A.H., van der Poll, T. y van de Beek, D. (2009) Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* **9**: 31–44.
- Brown, E.J., Hosea, S.W. y Frank, M.M. (1983) The role of antibody and complement in the reticuloendothelial clearance of pneumococci from the bloodstream. *Rev. Infect. Dis.* **5 Suppl 4**: S797–S805.
- Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., et al. (2002) The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 16969–16974.
- Bullard, D.C., Kunkel, E.J., Kubo, H., Hicks, M.J., Lorenzo, I., Doyle, N.A., et al. (1996) Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J. Exp. Med* **183**: 2329–2336.
- Burian, A., Wagner, C., Stanek, J., Manafi, M., Böhmendorfer, M., Jäger, W. y Zeitlinger, M. (2011) Plasma protein binding may reduce antimicrobial activity by preventing intra-bacterial uptake of antibiotics, for example clindamycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 134–137.
- Butterfield, E.E. y Peabody, F.W. (1913) The action of pneumococcus on blood. *J. Exp. Med.* **17**: 587–592.
- Büttner, D. (2012) Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**: 262–310.
- Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P. y Cossart, P. (2004) Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol. Microbiol.* **51**: 1601–1614.

- Cafini, F., Yuste, J., Giménez, M.-J., Sevillano, D., Aguilar, L., Alou, L., *et al.* (2010) Enhanced in vivo activity of cefditoren in pre-immunized mice against penicillin-resistant *S. pneumoniae* (serotypes 6B, 19F and 23F) in a sepsis model. *PLoS One* **5**: e12041.
- Calix, J.J. y Nahm, M.H. (2010) A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J. Infect. Dis.* **202**: 29–38.
- Calix, J.J., Porambo, R.J., Brady, A.M., Larson, T.R., Yother, J., Abeygunwardana, C. y Nahm, M.H. (2012) Biochemical, genetic and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *J. Biol. Chem.* **287**: 27885–27894.
- Campuzano, S., Serra, B., Llull, D., García, J.L. y García, P. (2009) Cloning, expression, and characterization of a peculiar choline-binding β -galactosidase from *Streptococcus mitis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5972–5980.
- Canvin, J.R., Marvin, A.P., Sivakumaran, M., Paton, J.C., Boulnois, G.J., Andrew, P.W. y Mitchell, T.J. (1995) The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J. Infect. Dis.* **172**: 119–123.
- Casadevall, A. (1996) Crisis in infectious diseases: time for a new paradigm? *Clin. Infect. Dis.* **23**: 790–794.
- Casadevall, A. y Pirofski, L.-a. (2004) New concepts in antibody-mediated immunity. *Infect. Immun.* **72**: 6191–6196.
- Casadevall, A. y Scharff, M.D. (1994) Serum therapy revisited: animal models of infection and development of passive antibody therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**: 1695–1702.
- Casadevall, A. y Scharff, M.D. (1995) Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* **21**: 150–161.
- Casal, J., Aguilar, L., Jado, I., Yuste, J., Giménez, M.J., Prieto, J. y Fenoll, A. (2002) Effects of specific antibodies against *Streptococcus pneumoniae* on pharmacodynamic parameters of β -lactams in a mouse sepsis model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 1340–1344.
- Catalão, M.J., Gil, F., Moniz-Pereira, J., São-José, C. y Pimentel, M. (2012) Diversity in bacterial lysis systems: bacteriophages show the way. *FEMS Microbiol. Rev.*: doi:10.1111/1574-6976.12006.
- Cecil, R.L. y Austin, J.H. (1918) Results of prophylactic inoculation against pneumococcus in 12,519 men. *J. Exp. Med.* **28**: 19–41.
- Celik, I., Stover, C., Botto, M., Thiel, S., Tzima, S., Kunkel, D., *et al.* (2001) Role of the classical pathway of complement activation in experimentally induced polymicrobial peritonitis. *Infect. Immun.* **69**: 7304–7309.
- Chang, Y.-C., Uchiyama, S., Varki, A. y Nizet, V. (2012) Leukocyte inflammatory responses provoked by pneumococcal sialidase. *mBio* **3**: e00220-11.
- Chatzi, K.E., Sardis, M.F., Karamanou, S. y Economou, A. (2013) Breaking on through to the other side: protein export through the bacterial Sec system. *Biochem. J.* **449**: 27–37.
- Chen, D.K., McGeer, A., de Azavedo, J.C. y Low, D.E. for the Canadian Bacterial Surveillance Network (1999) Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. *N. Engl. J. Med.* **341**: 233–239.
- Chen, G., Shaw, M.H., Kim, Y.G. y Nunez, G. (2009) NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu. Rev. Pathol.* **4**: 365–398.
- Chen, I. y Dubnau, D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 241–249.
- Cheng, Q., Finkel, D. y Hostetter, M.K. (2000) Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochemistry* **39**: 5450–5457.
- Chiavolini, D., Pozzi, G. y Ricci, S. (2008) Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**: 666–685.

BIBLIOGRAFÍA

- Chimalapati, S., Cohen, J.M., Camberlein, E., MacDonald, N., Durmort, C., Vernet, T., *et al.* (2012) Effects of deletion of the *Streptococcus pneumoniae* lipoprotein diacylglyceryl transferase gene *lgt* on ABC transporter function and on growth *in vivo*. *PLoS One* **7**: e41393.
- Chmouryguina, I., Suvorov, A., Ferrieri, P. y Cleary, P.P. (1996) Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infect. Immun.* **64**: 2387–2390.
- Clarke, T.B., Francella, N., Huegel, A. y Weiser, J.N. (2011) Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium. *Cell Host Microbe* **9**: 404–414.
- Claverys, J.-P. y Håvarstein, L.S. (2007) Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 219–229.
- Cole, R. (1914a) Pneumococcus hemotoxin. *J. Exp. Med.* **20**: 346–362.
- Cole, R. (1914b) The production of methemoglobin by pneumococci. *J. Exp. Med.* **20**: 363–378.
- Cole, R. y Moore, H.F. (1917) The production of antipneumococcal serum. *J. Exp. Med.* **26**: 537–561.
- Cossart, P. y Sansonetti, P.J. (2004) Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242–248.
- Courvalin, P. y Carlier, C. (1987) Tn 1545: a conjugative shuttle transposon. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 259–264.
- Craig, W.A. (1998) Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin. Infect. Dis.* **26**: 1–12.
- Craig, W.A., Redington, J. y Ebert, S.C. (1991) Pharmacodynamics of amikacin in vitro and in mouse thigh and lung infections. *J. Antimicrob. Chemother.* **27 (Suppl. C)**: 29–40.
- Croker, B.A., Roberts, A.W. y Nicola, N.A. (2012) Towards a four-dimensional view of neutrophils. *Methods Mol. Biol.* **844**: 87–99.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idänpään-Heikkilä, I. y Tuomanen, E.I. (1995) *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**: 435–438.
- Dahlgren, C. y Karlsson, A. (1999) Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Methods* **232**: 3–14.
- Dalia, A.B. y Weiser, J.N. (2011) Minimization of bacterial size allows for complement evasion and is overcome by the agglutinating effect of antibody. *Cell Host Microbe* **10**: 486–496.
- Dalia, A.B., Standish, A.J. y Weiser, J.N. (2010) Three surface exoglycosidases from *Streptococcus pneumoniae*, NanA, BgaA, and StrH, promote resistance to opsonophagocytic killing by human neutrophils. *Infect. Immun.* **78**: 2108–2116.
- Daniely, D., Portnoi, M., Shagan, M., Porgador, A., Givon-Lavi, N., Ling, E., *et al.* (2006) Pneumococcal 6-phosphogluconate-dehydrogenase, a putative adhesin, induces protective immune response in mice. *Clin. Exp. Immunol.* **144**: 254–263.
- Darveau, R.P. y Cunningham, M.D. (1990) Influence of subinhibitory concentrations of cephalosporins on the serum sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* **162**: 914–921.
- Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M.K. y McDaniel, L.S. (2001) PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect. Immun.* **69**: 3435–3437.
- Davis, K.M. y Weiser, J.N. (2011) Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infect. Immun.* **79**: 562–570.
- Davis, K.M., Nakamura, S. y Weiser, J.N. (2011) Nod2 sensing of lysozyme-digested peptidoglycan promotes macrophage recruitment and clearance of *S. pneumoniae* colonization in mice. *J. Clin. Invest.* **121**: 3666–3676.
- Deban, L., Jarva, H., Lehtinen, M.J., Bottazzi, B., Bastone, A., Doni, A., *et al.* (2008) Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation. *J. Immunol.* **181**: 8433–8440.

- de la Campa, A.G., Balsalobre, L., Ardanuy, C., Fenoll, A., Pérez-Trallero, E., Liñares, J. y Spanish Pneumococcal Infection Study Network G03/103. (2004) Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 1761–1759.
- de la Campa, A.G., Ardanuy, C., Balsalobre, L., Pérez-Trallero, E., Marimón, J.M., Fenoll, A. y Liñares, J. (2009) Changes in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* after 7-valent conjugate vaccination, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 905–911.
- de las Rivas, B., García, J.L., López, R. y García, P. (2001) Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb. Drug Resist.* **7**: 213–222.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R. y García, P. (2002) Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- β -N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J. Bacteriol.* **184**: 4988–5000.
- Dejana, E., Orsenigo, F. y Lampugnani, M.G. (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell Sci.* **121**: 2115–2122.
- del Pozo, J.L. (2008) Update and actual trends on bacterial infections following liver transplantation. *World J. Gastroenterol.* **14**: 4977–4983.
- Demarest, S.J., Salbato, J., Elia, M., Zhong, J., Morrow, T., Holland, T., *et al.* (2005) Structural characterization of the cell wall binding domains of *Clostridium difficile* toxins A and B; evidence that Ca^{2+} plays a role in toxin A cell surface association. *J. Mol. Biol.* **346**: 1197–1206.
- Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N. y Hanahan, D.J. (1979) Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J. Biol. Chem.* **254**: 9355–9358.
- Denapaite, D. y Hakenbeck, R. (2011) A new variant of the capsule 3 cluster occurs in *Streptococcus pneumoniae* from deceased wild chimpanzees. *PLoS One* **6**: e25119.
- Denapaite, D., Brückner, R., Nuhn, M., Reichmann, P., Henrich, B., Maurer, P., *et al.* (2010) The genome of *Streptococcus mitis* B6 – What is a commensal? *PLoS One* **5**: e9426.
- Des Prez, R.M., Bryan, C.S., Hawiger, J. y Colley, D.G. (1975) Function of the classical and alternate pathways of human complement in serum treated with ethylene glycol tetraacetic acid and $MgCl_2$ -ethylene glycol tetraacetic acid. *Infect. Immun.* **11**: 1235–1243.
- Dieudonné-Vatran, A., Krentz, S., Blom, A.M., Meri, S., Henriques-Normark, B., Riesbeck, K. y Albiger, B. (2009) Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion. *J. Immunol.* **182**: 7865–7877.
- Dogan, S., Zhang, Q., Pridmore, A.C., Mitchell, T.J., Finn, A. y Murdoch, C. (2011) Pneumolysin-induced CXCL8 production by nasopharyngeal epithelial cells is dependent on calcium flux and MAPK activation via Toll-like receptor 4. *Microbes Infect.* **13**: 65–75.
- Domenech, M., García, E. y Moscoso, M. (2009) Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. *Environ. Microbiol.* **11**: 2542–2555.
- Domenech, M., García, E. y Moscoso, M. (2011) In vitro destruction of *Streptococcus pneumoniae* biofilms with bacterial and phage peptidoglycan hydrolases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 4144–4148.
- Domenech, M., García, E. y Moscoso, M. (2012) Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Biotechnol.* **5**: 455–465.
- Domenech, M., García, E., Prieto, A. y Moscoso, M. (2013) Insight into the composition of the intercellular matrix of *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *Environ. Microbiol.* **15**: 502–516.
- dos Santos, G., Kutuzov, M.A. y Ridge, K.M. (2012) The inflammasome in lung diseases. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **303**: L627–L633.
- Dunstone, M.A. y Tweten, R.K. (2012) Packing a punch: the mechanism of pore formation by cholesterol dependent cytolysins and membrane attack complex/perforin-like proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**: 342–349.

BIBLIOGRAFÍA

- Dziarski, R. y Gupta, D. (2005) Peptidoglycan recognition in innate immunity. *J. Endotoxin Res.* **11**: 304–310.
- Dziarski, R., Kashyap, D.R. y Gupta, D. (2012) Mammalian peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating two-component systems and modulate microbiome and inflammation. *Microb. Drug Resist.* **18**: 280–285.
- Eberhardt, A., Hoyland, C.N., Vollmer, D., Bisle, S., Cleverley, R.M., Johnsborg, O., *et al.* (2012) Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Drug Resist.* **18**: 240–255.
- Eggleton, P., Gargan, R. y Fisher, D. (1989) Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J. Immunol. Methods* **121**: 105–113.
- Eisen, D.P. (2010) Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection. *J. Innate Immun.* **2**: 114–122.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Straume, D., Ohnstad, H.S., Berg, K.H., Hermoso, J.A. y Håvarstein, L.S. (2010) Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Mol. Microbiol.* **76**: 905–917.
- Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J. y Flavell, Richard A. (2011) Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. *Immunity* **34**: 665–679.
- Elliott, T.S.J. y Rodgers, F.G. (1985) Morphological response and growth characteristics of *Legionella pneumophila* exposed to ampicillin and erythromycin. *J. Med. Microbiol.* **19**: 383–390.
- Elm, C., Rohde, M., Vaerman, J.P., Chhatwal, G.S. y Hammerschmidt, S. (2004) Characterization of the interaction of the pneumococcal surface protein SpsA with the human polymeric immunoglobulin receptor (hplgR). *Indian J. Med. Res.* **119 Suppl**: 61–65.
- Endo, Y., Matsushita, M. y Fujita, T. (2011) The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**: 705–712.
- Endo, Y., Takahashi, M., Iwaki, D., Ishida, Y., Nakazawa, N., Kodama, T., *et al.* (2012) Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* Infection. *J. Immunol.* **189**: 5860–5866.
- Esposito, S. y Principi, N. (2013) Pharmacotherapy for pneumococcal infections: an update. *Expert Opin. Pharmacother.* **14**: 65–77.
- Etzioni, A. (2007) Leukocyte adhesion deficiencies: molecular basis, clinical findings, and therapeutic options. *Adv. Exp. Med. Biol.* **601**: 51–60.
- Exley, R.M., Shaw, J., Mowe, E., Sun, Y.-h., West, N.P., Williamson, M., *et al.* (2005) Available carbon source influences the resistance of *Neisseria meningitidis* against complement. *J. Exp. Med.* **201**: 1637–1645.
- Fairn, G.D. y Grinstein, S. (2012) How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* **33**: 397–405.
- Feldman, C. y Anderson, R. (2011) Bacteraemic pneumococcal pneumonia: current therapeutic options. *Drugs* **71**: 131–153.
- Fenoll, A., Martín Bourgon, C., Muñoz, R., Vicioso, D. y Casal, J. (1991) Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979–1989. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 56–60.
- Fenoll, A., Muñoz, R., García, E. y de la Campa, A.G. (1994) Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F₀ complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H⁺-ATPases. *Mol. Microbiol.* **12**: 587–598.
- Fenoll, A., Giménez, M., Robledo, O., Aguilar, L., Tarragó, D., Granizo, J. y Martín-Herrero, J. (2008) Influence of penicillin/amoxicillin non-susceptibility on the activity of third-generation cephalosporins against *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **27**: 75–80.

- Fenoll, A., Granizo, J.J., Aguilar, L., Giménez, M.J., Aragoneses-Fenoll, L., Hanquet, G., *et al.* (2009) Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* **47**: 1012–1020.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G. y Romero, A. (2001) A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat. Struct. Biol.* **8**: 1020–1024.
- Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G. y Romero, A. (2002) Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J. Mol. Biol.* **321**: 163–173.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J.E., *et al.* (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.* **38**: D211–D222.
- Fischer, W., Behr, T., Hartmann, R., Peter-Katalinić, J. y Egge, H. (1993) Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoid acid (C polysaccharide). *Eur. J. Biochem.* **215**: 851–857.
- Fleck, R.A., Romero-Steiner, S. y Nahm, M.H. (2005) Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**: 19–27.
- Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **10**: 226–236.
- Fletcher, M.A. y Fritzell, B. (2007) Brief review of the clinical effectiveness of PREVENAR® against otitis media. *Vaccine* **25**: 2507–2512.
- Forster, B.M. y Marquis, H. (2012) Protein transport across the cell wall of monoderm Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **84**: 405–413.
- Franchi, L., Eigenbrod, T., Muñoz-Planillo, R. y Nuñez, G. (2009a) The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat. Immunol.* **10**: 241–247.
- Franchi, L., Eigenbrod, T. y Nuñez, G. (2009b) Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J. Immunol.* **183**: 792–796.
- Frolet, C., Beniazza, M., Roux, L., Gallet, B., Noirclerc-Savoie, M., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2010) New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiol.* **10**: 190.
- Fukuda, Y., Yanagihara, K., Higashiyama, Y., Miyazaki, Y., Hirakata, Y., Mukae, H. *et al.* (2006) Effects of macrolides on pneumolysin of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. Respir. J.* **27**: 1020–1025.
- Gámez, G. y Hammerschmidt, S. (2012) Combat pneumococcal infections: adhesins as candidates for protein-based vaccine development. *Curr. Drug Targets* **13**: 323–337.
- García, E. (2009) Cefditoren-pivoxil: from chemistry to molecular microbiology. En *From Microbiology to Clinical Practice. The cefditoren case*. Giménez, M.J., Aguilar, L. y Coronel, P. (eds). Madrid: SiCom XXI, S.L., pp. 25–41.
- García, E., García, J.L., Ronda, C., García, P. y López, R. (1985) Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **201**: 225–230.
- García, J.L., García, E. y López, R. (1987) Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Microbiol.* **149**: 52–56.
- García, E., García, J.L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J.M. y López, R. (1988) Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 914–918.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R. y García, J.L. (1999a) LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol. Microbiol.* **31**: 1275–1277.

BIBLIOGRAFÍA

- García, P., González, M.P., García, E., García, J.L. y López, R. (1999b) The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol. Microbiol.* **33**: 128–138.
- García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., Medrano, F.J. y López, R. (2000) Versatility of choline-binding domain. En *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. Tomasz, A. (ed). Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, pp. 231–244.
- García, B.L., Ramyar, K.X., Ricklin, D., Lambris, J.D. y Geisbrecht, B.V. (2012) Advances in understanding the structure, function, and mechanism of the SCIN and Efb families of staphylococcal immune evasion proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* **946**: 113–133.
- García-Bustos, J.F., Chait, B.T. y Tomasz, A. (1988) Altered peptidoglycan structure in a pneumococcal transformant resistant to penicillin. *J. Bacteriol.* **170**: 2143–2147.
- García-Laorden, M.I., de Castro, F.R., Solé-Violán, J., Payeras, A., Briones, M.L., Borderías L., et al. (2013) The role of mannose-binding lectin on pneumococcal infection. *Eur. Resp. J.* **41**: 131–139.
- Garnacho-Montero, J., García-Cabrera, E., Jiménez-Álvarez, R., Díaz-Martín, A., Revuelto-Rey, J., Aznar-Martín, J. y Garnacho-Montero, C. (2012) Genetic variants of the MBL2 gene are associated with mortality in pneumococcal sepsis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **73**: 39–44.
- Gaziano, R., Bozza, S., Bellocchio, S., Perruccio, K., Montagnoli, C., Pitzurra, L., et al. 2004. Anti-*Aspergillus fumigatus* efficacy of pentraxin 3 alone and in combination with antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**: 4414–4421.
- Glover, D.T., Hollingshead, S.K. y Briles, D.E. (2008) *Streptococcus pneumoniae* surface protein PcpA elicits protection against lung infection and fatal sepsis. *Infect. Immun.* **76**: 2767–2776.
- Golda, A., Malek, N., Dudek, B., Zeglen, S., Wojarski, J., Ochman, M., et al. (2011) Infection with human coronavirus NL63 enhances streptococcal adherence to epithelial cells. *J. Gen. Virol.* **92**: 1358–1368.
- Gómez-Lus, M.L., Aguilar, L., Martín, M., Giménez, M.J., Martínez, P. y Prieto, J. (1997) Intracellular and extracellular killing of a penicillin-resistant, serotype-9 strain of *Streptococcus pneumoniae* by polymorphonuclear leucocytes in the presence of sub-inhibitory concentrations of clavulanic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**: 142–144.
- Gómez-Lus, M.L., Giménez, M.J., Prieto, J., Martín, M., Frías, J. y Aguilar, L. (1998) Effect of polymorphonuclear neutrophils on serum bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* after amoxicillin administration. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**: 40–43.
- González, N., Aguilar, L., Alou, L., Giménez, M.-J., Sevillano, D., Torrico, M., et al. (2009) Influence of different resistance traits on the competitive growth of *Haemophilus influenzae* in antibiotic-free medium and selection of resistant populations by different β -lactams: an *in vitro* pharmacodynamic approach. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**: 1215–1222.
- Goodman, J.L., Nelson, C.M., Klein, M.B., Hayes, S. y Weston, B.W. (1999) Leukocyte infection by the granulocytic ehrlichiosis agent is linked to expression of a selectin ligand. *J. Clin. Invest.* **103**: 407–412.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I. y Masure, H.R. (2000) Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **68**: 5690–5695.
- Granizo, J.J., Sádaba, B., Honorato, J., Gimenez, M.J., Sevillano, D., Aguilar, L. y Coronel P. 2008. Monte Carlo simulation describing the pharmacodynamic profile of cefditoren in plasma from healthy volunteers. *Int. J. Antimicrob. Agents* **31**: 396–398.
- Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**: 113–159.
- Grigg, J. (2012) The platelet activating factor receptor: a new anti-infective target in respiratory disease? *Thorax* **67**: 840–841.

- Haas, W., Hesje, C.K., Sanfilippo, C.M. y Morris, T.W. (2011) High proportion of nontypeable *Streptococcus pneumoniae* isolates among sporadic, nonoutbreak cases of bacterial conjunctivitis. *Curr. Eye Res.* **36**: 1078–1085.
- Hagerman, A., Posfay-Barbe, K.M., Grillet, S., Ochs, M.M., Brookes, R.H., Greenberg, D., *et al.* (2012) Influence of age, social patterns and nasopharyngeal carriage on antibodies to three conserved pneumococcal surface proteins (PhtD, PcpA and PrtA) in healthy young children. *Eur. J. Clin. Microb. Infect. Dis.* **32**: 43–49.
- Hakenbeck, R., Madhour, A., Denapaite, D. y Brückner, R. (2009) Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol. Rev* **33**: 572–586.
- Hammerschmidt, S., Talay, S.R., Brandtzaeg, P. y Chhatwal, G.S. (1997) SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol. Microbiol.* **25**: 1113–1124.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H. y Chhatwal, G.S. (1999) Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**: 1683–1687.
- Hammerschmidt, S., Tillig, M.P., Wolff, S., Vaerman, J.P. y Chhatwal, G.S. (2000) Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol. Microbiol.* **36**: 726–736.
- Hammerschmidt, S., Agarwal, V., Kunert, A., Haelbich, S., Skerka, C. y Zipfel, P.F. (2007) The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J. Immunol.* **178**: 5848–5858.
- Han, F., Yu, H., Tian, C., Li, S., Jacobs, M.R., Benedict-Alderfer, C. y Zheng, Q.Y. (2009) Role for Toll-like receptor 2 in the immune response to *Streptococcus pneumoniae* infection in mouse otitis media. *Infect. Immun.* **77**: 3100–3108.
- Hava, D.L. y Camilli, A. (2002) Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* **45**: 1389–1406.
- Hava, D.L., LeMieux, J. y Camilli, A. (2003) From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol. Microbiol.* **50**: 1103–1110.
- Håvarstein, L.S., Coomaraswamy, G. y Morrison, D.A. (1995) An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 11140–11144.
- Heidelberger, M. y Avery, O.T. (1923) The soluble specific substance of pneumococcus. *J. Exp. Med.* **38**: 73–79.
- Heidelberger, M. y Avery, O.T. (1924) The soluble specific substance of pneumococcus. Second paper. *J. Exp. Med.* **40**: 301–317.
- Heidelberger, M., Goebel, W.F. y Avery, O.T. (1925) The soluble specific substance of pneumococcus. Third paper. *J. Exp. Med.* **42**: 727–745.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. y Götz F. (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol. Microbiol.* **24**: 1013–1024.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., *et al.* (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**: 740–745.
- Henderson, B. y Martin, A. (2011) Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect. Immun.* **79**: 3476–3491.
- Hendriksen, W.T., Bootsma, H.J., Estevão, S., Hoogenboezem, T., de Jong, A., de Groot, R., *et al.* (2008) CodY of *Streptococcus pneumoniae*: link between nutritional gene regulation and colonization. *J. Bacteriol.* **190**: 590–601.

BIBLIOGRAFÍA

- Henrichsen, J. (1995) Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2759–2762.
- Henriques-Normark, B. y Normark, S. (2010) Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Exp. Cell Res.* **316**: 1408–1414.
- Henriques, B., Kalin, M., Örtqvist, Å., Olsson Liljequist, B., Almela, M., Marrie, T.J., *et al.* (2000) Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *J. Infect. Dis.* **182**: 833–839.
- Hensel, M., Shea, J.E., Waterman, S.R., Mundy, R., Nikolaus, T., Banks, G., *et al.* (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol. Microbiol.* **30**: 163–174.
- Hermoso, J.A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M., *et al.* (2005) Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 533–538.
- Herron, M.J., Nelson, C.M., Larson, J., Snapp, K.R., Kansas, G.S. y Goodman, J.L. (2000) Intracellular parasitism by the human granulocytic ehrlichiosis bacterium through the P-selectin ligand, PSGL-1. *Science* **288**: 1653–1656.
- Hidari, K. I., Weyrich, A.S., Zimmerman, G.A. y McEver, R.P. (1997) Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **272**: 28750–28756.
- Hirst, R., Gosai, B., Rutman, A., Guerin, C., Nicotera, P., Andrew, P. y O'Callaghan, C. (2008) *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J. Infect. Dis.* **197**: 744–751.
- Ho, J.G.S., Greco, A., Rupnik, M. y Ng, K.K.-S. (2005) Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 18373–18378.
- Hoegen, T., Tremel, N., Klein, M., Angele, B., Wagner, H., Kirschning, C., *et al.* (2011) The NLRP3 inflammasome contributes to brain injury in pneumococcal meningitis and is activated through ATP-dependent lysosomal cathepsin B release. *J. Immunol.* **187**: 5440–5451.
- Hogg, N., Patzak, I. y Willenbrock, F. (2011) The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* **11**: 416–426.
- Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L. y Jenkinson, H.F. (2001) The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* **41**: 1395–1408.
- Höltje, J.-V. y Tomasz, A. (1974) Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **249**: 7032–7034.
- Höltje, J.-V. y Tomasz, A. (1975) Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by *N*-acetylmuramic acid γ -alanine amidase of pneumococcus. *J. Biol. Chem.* **250**: 6072–6076.
- Horne, D.S. y Tomasz, A. (1993) Possible role of a choline-containing teichoic acid in the maintenance of normal cell shape and physiology in *Streptococcus oralis*. *J. Bacteriol.* **175**: 1717–1722.
- Hotze, E.M. y Tweten, R.K. (2012) Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**: 1028–1038.
- Hotze, E.M., Le, H.M., Sieber, J.R., Bruxvoort, C., McInerney, M.J. y Tweten, R.K. (2013) Identification and characterization of the first cholesterol-dependent cytolysins from Gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* **81**: 216–225.
- Huang, B., Hubber, A., McDonough, J.A., Roy, C.R., Scidmore, M.A. y Carlyon, J.A. (2010) The *Anaplasma phagocytophilum*-occupied vacuole selectively recruits Rab-GTPases that are predominantly associated with recycling endosomes. *Cell. Microbiol.* **12**: 1292–1307.

- Hupp, S., Heimeroth, V., Wippel, C., Fortsch, C., Ma, J., Mitchell, T.J. e Iliev, A.I. (2012) Astrocytic tissue remodeling by the meningitis neurotoxin pneumolysin facilitates pathogen tissue penetration and produces interstitial brain edema. *Glia* **60**: 137–146.
- Hussain, M., Melegaro, A., Pebody, R.G., George, R., Edmunds, W.J., Talukdar, R., *et al.* (2005) A longitudinal household study of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting. *Epidemiol. Infect.* **133**: 891–898.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K. y Brown, J.S. (2010) The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect. Immun.* **78**: 704–715.
- Hyams, C., Trzcinski, K., Camberlein, E., Weinberger, D.M., Chimalapati, S., Noursadeghi, M., *et al.* (2013) *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype invasiveness correlates with the degree of factor H binding and opsonization with C3b/iC3b. *Infect. Immun.* **81**: 354–363.
- Iannelli, F., Oggioni, M.R. y Pozzi, G. (2002) Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene* **284**: 63–71.
- Imamura, Y., Higashiyama, Y., Tomono, K., Izumikawa, K., Yanagihara, K., Ohno, H., *et al.* (2005) Azithromycin exhibits bactericidal effects on *Pseudomonas aeruginosa* through interaction with the outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 1377–1380.
- Ippel, J.H., de Haas, C.J.C., Bunschoten, A., van Strijp, J.A.G., Kruijtzter, J.A.W., Liskamp, R.M.J. y Kemmink, J. (2009) Structure of the tyrosine-sulfated C5a receptor N terminus in complex with chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **284**: 12363–12372.
- Janeway, C. (2005) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science, New York, NY.
- Janeway, C.A., Jr. y Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 197–216.
- Jansen, W.T. y Snippe, H. (2004) Short-chain oligosaccharide protein conjugates as experimental pneumococcal vaccines. *Indian J. Med. Res.* **119**: S7–S12.
- Janulczyk, R., Iannelli, F., Sjöholm, A.G., Pozzi, G. y Björck, L. (2000) Hic, a novel surface protein of *Streptococcus pneumoniae* that interferes with complement function. *J. Biol. Chem.* **275**: 37257–37263.
- Jarva, H., Jokiranta, T.S., Wurzner, R. y Meri, S. (2003) Complement resistance mechanisms of streptococci. *Mol. Immunol.* **40**: 95–107.
- Jedrzejas, M.J. (2006) Unveiling molecular mechanisms of pneumococcal surface protein A interactions with antibodies and lactoferrin. *Clin. Chim. Acta* **367**: 1–10.
- Johnson, M.K., Hamon, D. y Drew, G.K. (1982) Isolation and characterization of pneumolysin-negative mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **37**: 837–839.
- Johnston, J.W., Myers, L.E., Ochs, M.M., Benjamin, W.H., Jr., Briles, D.E. y Hollingshead, S.K. (2004) Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infect. Immun.* **72**: 5858–5867.
- Johnston, J.W., Briles, D.E., Myers, L.E. y Hollingshead, S.K. (2006) Mn²⁺-dependent regulation of multiple genes in *Streptococcus pneumoniae* through PsaR and the resultant impact on virulence. *Infect. Immun.* **74**: 1171–1180.
- Joiner, K.A., Brown, E.J. y Frank, M.M. (1984) Complement and bacteria: chemistry and biology in host defence. *Annu. Rev. Immunol.* **2**: 461–492.
- Jomaa, M., Yuste, J., Paton, J.C., Jones, C., Dougan, G. y Brown, J.S. (2005) Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **73**: 6852–6859.
- Jomaa, M., Terry, S., Hale, C., Jones, C., Dougan, G. y Brown, J. (2006) Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* **24**: 5133–5139.

BIBLIOGRAFÍA

- Jung, E., Feldhoff, R.C., Walz, B.M., Drehs, M.M., Buchheit, J.Q. y Lassiter, H.A. (1998) Complement component C9 enhances the capacity of beta-lactam antibiotics to kill *Escherichia coli* in vitro and in vivo. *Am. J. Med. Sci.* **315**: 307–313.
- Jung, C.-J., Zheng, Q.-H., Shieh, Y.-H., Lin, C.-S. y Chia, J.-S. (2009) *Streptococcus mutans* autolysin AtlA is a fibronectin-binding protein and contributes to bacterial survival in the bloodstream and virulence for infective endocarditis. *Mol. Microbiol.* **74**: 888–902.
- Kadioglu, A., Taylor, S., Iannelli, F., Pozzi, G., Mitchell, T.J. y Andrew, P.W. (2002) Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect. Immun.* **70**: 2886–2890.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C. y Andrew, P.W. (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 288–301.
- Kadioglu, A., Brewin, H., Härtel, T., Brittan, J.L., Klein, M., Hammerschmidt, S. y Jenkinson, H.F. (2010) Pneumococcal protein PavA is important for nasopharyngeal carriage and development of sepsis. *Mol. Oral Med.* **25**: 50–60.
- Kaetzel, C.S. (2005) The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol. Rev.* **206**: 83–99.
- Kagawa, T.F., O'Connell, M.R., Mouat, P., Paoli, M., O'Toole, P.W. y Cooney, J.C. (2009) Model for substrate interactions in C5a peptidase from *Streptococcus pyogenes*: a 1.9 Å crystal structure of the active form of ScpA. *J. Mol. Biol.* **386**: 754–772.
- Kamerling, J.P. (2000) Pneumococcal polysaccharides: a chemical view. En *Streptococcus pneumoniae. Molecular Biology & Mechanisms of Disease*. Tomasz, A. (ed). Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, Inc, pp. 81–114.
- Kang, Y.-S., Do, Y., Lee, H.-K., Park, S.H., Cheong, C., Lynch, R.M., et al. (2006) A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell* **125**: 47–58.
- Kansas, G.S. (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* **88**: 3259–3287.
- Kawai, T. y Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**: 373–384.
- Kawai, T. y Akira, S. (2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**: 637–650.
- Kersse, K., Bertrand, M.J.M., Lamkanfi, M. y Vandenabeele, P. (2011) NOD-like receptors and the innate immune system: coping with danger, damage and death. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**: 257–276.
- Khan, M.N., Sharma, S.K., Filkins, L.M. y Pichichero, M.E. (2012) PcpA of *Streptococcus pneumoniae* mediates adherence to nasopharyngeal and lung epithelial cells and elicits functional antibodies in humans. *Microb. Infect.* **14**: 1102–1110.
- Kharat, A.S. y Tomasz, A. (2006) Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Mol. Microbiol.* **60**: 93–107.
- Kim, D.D. y Song, W.-C. (2006) Membrane complement regulatory proteins. *Clin. Immunol.* **118**: 127–136.
- Kim, J.O. y Weiser, J.N. (1998) Association of intrastain phase variation in quantity of capsular polysaccharide and teichoic acid with the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **177**: 368–377.
- Kim, H.K., Thamavongsa, V., Schneewind, O. y Missiakas, D. (2012) Recurrent infections and immune evasion strategies of *Staphylococcus aureus*. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**: 92–99.
- King, S.J., Hippe, K.R. y Weiser, J.N. (2006) Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **59**: 961–974.

- Kjaer, T.R., Hansen, A.G., Sørensen, U.B.S., Holm, A.T., Sørensen, G.L., Jensenius, J.C. y Thiel, S. (2013) M-ficolin binds selectively to the capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19B and 19C and of a *Streptococcus mitis* strain. *Infect. Immun.* **81**: 452–459.
- Kloosterman, T.G., Witwicki, R.M., van der Kooi-Pol, M.M., Bijlsma, J.J.E. y Kuipers, O.P. (2008) Opposite effects of Mn²⁺ and Zn²⁺ on PsaR-mediated expression of the virulence genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **190**: 5382–5393.
- Knapp, S., Wieland, C.W., van 't Veer, C., Takeuchi, O., Akira, S., Florquin, S. y van der Poll, T. (2004) Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J. Immunol.* **172**: 3132–3138.
- Koedel, U. (2009) Toll-like receptors in bacterial meningitis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **336**: 15–40.
- Koedel, U., Winkler, F., Angele, B., Fontana, A., Flavell, R.A. y Pfister, H.W. (2002) Role of caspase-1 in experimental pneumococcal meningitis: evidence from pharmacologic caspase inhibition and caspase-1-deficient mice. *Ann. Neurol.* **51**: 319–329.
- Koppe, U., Suttorp, N. y Opitz, B. (2012) Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell. Microbiol.* **14**: 460–466.
- Koppel, E.A., Wieland, C.W., van den Berg, V.C., Litjens, M., Florquin, S., van Kooyk, Y., *et al.* (2005) Specific ICAM-3 grabbing nonintegrin-related 1 (SIGNR1) expressed by marginal zone macrophages is essential for defense against pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur. J. Immunol.* **35**: 2962–2969.
- Koziel, J. y Potempa, J. (2013) Protease-armed bacteria in the skin. *Cell Tissue Res.* **351**: 325–337.
- Krupar, A., Sørensen, U.B.S., Matsushita, M., Jensenius, J.C. y Thiel, S. (2005) Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. *Infect. Immun.* **73**: 1052–1060.
- Kum, W.W.S., Lee, S., Grassl, G.A., Bidshahri, R., Hsu, K., Ziltener, H.J. y Finlay, B.B. (2009) Lack of functional P-selectin ligand exacerbates *Salmonella* serovar typhimurium infection. *J. Immunol.* **182**: 6550–6561.
- Kum, W.W.S., Lo, B.C., Deng, W., Ziltener, H.J. y Finlay, B.B. (2010) Impaired innate immune response and enhanced pathology during *Citrobacter rodentium* infection in mice lacking functional P-selectin. *Cell. Microbiol.* **12**: 1250–1271.
- Kumar, H., Kawai, T. y Akira, S. (2011) Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* **30**: 16–34.
- Kumar, S., Ingle, H., Prasad, D.V.R. y Kumar, H. (2012) Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit. Rev. Microbiol.* doi:10.3109/1040841X.1042012.1706249.
- Kuo, C.-F., Lin, Y.-S., Chuang, W.-J., Wu, J.-J. y Tsao, N. (2008) Degradation of complement 3 by streptococcal pyrogenic exotoxin B inhibits complement activation and neutrophil opsonophagocytosis. *Infect. Immun.* **76**: 1163–1169.
- Kushner, I. y Samols, D. (2011) Oswald Avery and the pneumococcus. *Pharos Alpha Omega Alpha Honor Med. Soc.* **74**: 14–18.
- Laarman, A.J., Ruyken, M., Malone, C.L., van Strijp, J.A.G., Horswill, A.R. y Rooijackers, S.H.M. (2011) *Staphylococcus aureus* metalloprotease aureolysin cleaves complement C3 to mediate immune evasion. *J. Immunol.* **186**: 6445–6453.
- Labro, M-T. (2000) Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or "immuno-fairy tales"? *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 615–650.
- Lacks, S. y Hotchkiss, R.D. (1960) A study of the genetic material determining an enzyme activity in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* **39**: 508–518.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.

BIBLIOGRAFÍA

- Lambris, J.D., Ricklin, D. y Geisbrecht, B.V. (2008) Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 132–142
- Lamkanfi, M. y Dixit, V.M. (2012) Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **28**:137–161.
- Lanie, J.A., Ng, W.-L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., *et al.* (2007) Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J. Bacteriol.* **189**: 38–51.
- Lebon, A., Verkaik, N.J., Labout, J.A.M., de Vogel, C.P., Hooijkaas, H., Verbrugh, H.A., *et al.* (2011) Natural antibodies against several pneumococcal virulence proteins in children during the pre-pneumococcal-vaccine era: The generation R study. *Infect. Immun.* **79**: 1680–1687.
- Leclercq, R. y Courvalin, P. (2002) Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**: 2727–2734.
- Lesinski, G.B. y Westerink, M.A. (2001) Vaccines against polysaccharide antigens. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **1**: 325–334.
- Letiembre, M., Echchannaoui, H., Bachmann, P., Ferracin, F., Nieto, C., Espinosa, M. y Landmann, R. (2005a) Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes. *Infect. Immun.* **73**: 8397–8401.
- Letiembre, M., Echchannaoui, H., Ferracin, F., Rivest, S. y Landmann, R. (2005b) Toll-like receptor-2 deficiency is associated with enhanced brain TNF gene expression during pneumococcal meningitis. *J. Neuroimmunol.* **168**: 21–33.
- Libman, E. (1905) A pneumococcus producing a peculiar form of hemolysis. *Proc. N. Y. Pathol. Soc.* **V**: 168.
- Lingappa, J.R., Dumitrescu, L., Zimmer, S.M., Lynfield, R., McNicholl, J.M., Messonnier, N.E., *et al.* (2011) Identifying host genetic risk factors in the context of public health surveillance for invasive pneumococcal disease. *PLoS One* **6**: e23413.
- Liñares, J., Ardanuy, C., Pallares, R. y Fenoll, A. (2010) Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**: 402–410.
- Lipsitch, M., Whitney, C.G., Zell, E., Kajjalainen, T., Dagan, R. y Malley, R. (2005) Are anticapsular antibodies the primary mechanism of protection against invasive pneumococcal disease? *PLoS Med.* **2**: e15.
- Lister, F.S. (1916) An experimental study of prophylactic inoculation against pneumococcal infection in the rabbit and in man. *Pub. S. Afr. Inst. Med. Res.* **8**: 231–287.
- Lister, F.S. (1917) Prophylactic inoculation of man against pneumococcal infections, and more particularly against lobar pneumonia. *Pub. S. Afr. Inst. Med. Res.* **10**: 304–322.
- Liu, X., Chauhan, V.S., Young, A.B. y Marriott, I. (2010) NOD2 mediates inflammatory responses of primary murine glia to *Streptococcus pneumoniae*. *Glia* **58**: 839–847.
- Llull, D., López, R. y García, E. (2001) Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci. *Curr. Mol. Med.* **1**: 475–491.
- Llull, D., López, R. y García, E. (2006) Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 1250–1256.
- López, R. (2006) Pneumococcus: the sugar-coated bacteria. *Int. Microbiol.* **9**: 179–190.
- López, R. y García, E. (2004) Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**: 553–580.
- Lu, L., Ma, Y. y Zhang, J.R. (2006) *Streptococcus pneumoniae* recruits complement factor H through the amino terminus of CbpA. *J. Biol. Chem.* **281**: 15464–15474.

- Luján, M., Gallego, M., Belmonte, Y., Fontanals, D., Vallès, J., Lisboa, T. y Rello, J. (2010) Influence of pneumococcal serotype group on outcome in adults with bacteremic pneumonia. *Eur. Respir. J.* **36**: 1073–1079.
- Lund, E. y Henrichsen, J. (1978) Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods Microbiol.* **12**: 241–262.
- Luo, R., Mann, B., Lewis, W.S., Rowe, A., Heath, R., Stewart, M.L., *et al.* (2005) Solution structure of choline binding protein A, the major adhesin of *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO J.* **24**: 34–43.
- MacLeod, C.M. y Krauss, M.R. (1950) Relation of virulence of pneumococcal strains for mice to the quantity of capsular polysaccharide formed in vitro. *J. Exp. Med.* **92**: 1–9.
- MacLeod, C.M., Hodges, R.G., Heidelberger, M. y Bernhard, W.G. (1945) Prevention of pneumococcal pneumonia by immunization with specific capsular polysaccharides. *J. Exp. Med.* **82**: 445–465.
- Madhour, A., Maurer, P. y Hakenbeck, R. (2011) Cell surface proteins in *S. pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Iran. J. Microbiol.* **3**: 58–67.
- Majcherczyk, P.A., Langen, H., Heumann, D., Fountoulakis, M., Glauser, M.P. y Moreillon, P. (1999) Digestion of *Streptococcus pneumoniae* cell walls with its major peptidoglycan hydrolase releases branched stem peptides carrying proinflammatory activity. *J. Biol. Chem.* **274**: 12537–12543.
- Malfroot, A., Verhaegen, J., Dubru, J.-M., Van Kerschaver, E. y Leyman, S. (2004) A cross-sectional survey of the prevalence of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in Belgian infants attending day care centres. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**: 797–803.
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S.C., Cieslewicz, M.J., Lipsitch, M., Thompson, C.M., *et al.* (2003) Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 1966–1971.
- Manzano, C., Contreras-Martel, C., El Mortaji, L., Izoré, T., Fenel, D., Vernet, T., *et al.* (2008) Sortase-mediated pilus fiber biogenesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Structure* **16**: 1838–1848.
- Marriott, H.M., Mitchell, T.J. y Dockrell, D.H. (2008) Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr. Mol. Med.* **8**: 497–509.
- Martí-Lliteras, P., Regueiro, V., Morey, P., Hood, D.W., Saus, C., Sauleda, J., *et al.* (2009) Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect. Immun.* **77**: 4232–4242.
- Martin, B., García, P., Castanié, M.P. y Claverys, J.-P. (1995) The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol.* **15**: 367–379.
- Martín, M., Gómez-Lus, M.L., Aguilar, L., Martínez, P., Giménez, M.J y Prieto, J. (1997) Effect of clavulanic acid and/or polymorphonuclear neutrophils on amoxicillin bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**: 512–516.
- Martinez, J.E., Romero-Steiner, S., Pilishvili, T., Barnard, S., Schinsky, J., Goldblatt, D. y Carlone, G.M. (1999) A flow cytometric opsonophagocytic assay for measurement of functional antibodies elicited after vaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**: 581–586.
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J.C. y Wold, A.E. (2008) Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect. Immun.* **76**: 4079–4087.
- Martner, A., Skovbjerg, S., Paton, J.C. y Wold, A.E. (2009) *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. *Infect. Immun.* **77**: 3826–3837.
- Matthews, K.W., Mueller-Ortiz, S.L. y Wetsel, R.A. (2004) Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation. *Mol. Immunol.* **40**: 785–793.

BIBLIOGRAFÍA

- Maus, U.A., Srivastava, M., Paton, J.C., Mack, M., Everhart, M.B., Blackwell, T.S., *et al.* (2004) Pneumolysin-induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space. *J. Immunol.* **173**: 1307–1312.
- Maynard, G.D. (1915) Pneumonia inoculation experiment no III. *Med. J. S. Afr.* **11**: 36–39.
- McAllister, L.J., Tseng, H.-J., Ogunniyi, A.D., Jennings, M.P., McEwan, A.G. y Paton, J.C. (2004) Molecular analysis of the *psa* permease complex of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **53**: 889–901.
- McCarty, M. y Avery, O.T. (1946) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *J. Exp. Med.* **83**: 89–96.
- McCavit, T.L., Quinn, C.T., Techasaensiri, C. y Rogers, Z.R. (2011) Increase in invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in children with sickle cell disease since pneumococcal conjugate vaccine licensure. *J. Pediatr. Surg.* **158**: 505–507.
- McClelland, E.E., Nicola, A.M., Prados-Rosales, R. y Casadevall, A. (2010) Ab binding alters gene expression in *Cryptococcus neoformans* and directly modulates fungal metabolism. *J. Clin. Invest.* **120**: 1355–1361.
- McCool, T.L y Weiser, J.N. (2004) Limited role of antibody in clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a murine model of colonization. *Infect. Immun.* **72**: 5807–5813.
- McCullers, J.A. (2006) Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**: 571–582.
- McCullers, J.A. y Tuomanen, E.I. (2001) Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front. Biosci.* **6**: D877–D889.
- McDaniel, L.S., Yother, J., Vijayakumar, M., McGarry, L., Guild, W.R. y Briles, D.E. (1987) Use of an insertional inactivation to facilitate studies of biological properties of pneumococcal surface protein A (PspA). *J. Exp. Med.* **165**: 381–394.
- McEver, R.P. y Cummings, R.D. (1997) Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* **100**: S97–S103.
- Mehr, S. y Wood, N. (2012) *Streptococcus pneumoniae* – a review of carriage, infection, serotype replacement and vaccination. *Paediatr. Respir. Rev.* **13**: 258–264.
- Meli, D.N., Christen, S., Leib, S.L. y Täuber, M.G. (2002) Current concepts in the pathogenesis of meningitis caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **15**: 253–257.
- Mengin-Lecreux, D. y Lemaitre, B. (2005) Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J. Endotoxin Res.* **11**: 105–111.
- Mitchell, A.M. y Mitchell, T.J. (2010) *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**: 411–418.
- Moens, L., Van Hoeyveld, E., Peetermans, W.E., De Boeck, C., Verhaegen, J. y Bossuyt, X. (2006) Mannose-binding lectin genotype and invasive pneumococcal infection. *Hum. Immunol.* **67**: 605–611.
- Mold, C., Gresham, H.D. y Du Clos, T.W. (2001) Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine Fc γ Rs. *J. Immunol.* **166**: 1200–1205.
- Mold, C., Rodic-Polic, B. y Du Clos, T.W. (2002) Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fc γ receptors. *J. Immunol.* **168**: 6375–6381.
- Molina, R., González, A., Stelter, M., Pérez-Dorado, I., Kahn, R., Morales, M., *et al.* (2009) Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep.* **10**: 246–251.
- Mook-Kanamori, B.B., Geldhoff, M., van der Poll, T. y van de Beek, D. (2011) Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 557–591.

- Moore, L.J., Pridmore, A.C., Dower, S.K. y Read, R.C. (2003) Penicillin enhances the Toll-like receptor 2-mediated proinflammatory activity of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **188**: 1040–1048.
- Moreillon, P. y Majcherczyk, P.A. (2003) Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**: 632–641.
- Moreira, L.O. y Zamboni, D.S. (2012) NOD1 and NOD2 signaling in infection and inflammation. *Front. Immunol.* **3**: 328.
- Morens, D.M., Folkers, G.K. y Fauci, A.S. (2004) The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* **430**: 242–249.
- Morrison, D.A. (1978) Transformation in pneumococcus: protein content of eclipse complex. *J. Bacteriol.* **136**: 548–557.
- Moscoso, M. y Claverys, J.P. (2004) Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol. Microbiol.* **54**: 783–794.
- Moscoso, M. y García, E. (2009) Transcriptional regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae*: a bioinformatic analysis. *DNA Res.* **16**: 177–186.
- Moscoso, M., López, E., García, E. y López, R. (2005a) Implications of physiological studies based on genomic sequences: *Streptococcus pneumoniae* TIGR4 synthesizes a functional LytC lysozyme. *J. Bacteriol.* **187**: 6238–6241.
- Moscoso, M., Obregón, V., López, R., García, J.L. y García, E. (2005b) Allelic variation of the polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8706–8713.
- Moscoso, M., García, E. y López, R. (2006) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J. Bacteriol.* **188**: 7785–7795.
- Moscoso, M., Domenech, M. y García, E. (2010) Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol. Microbiol.* **77**: 1052–1064.
- Moschioni, M., Pansegrau, W. y Barocchi, M.A. (2010) Adhesion determinants of the *Streptococcus* species. *Microb. Biotechnol.* **3**: 370–388.
- Mosser, J.L. y Tomasz, A. (1970) Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. Biol. Chem.* **245**: 287–298.
- Mouton, J.W., Dudley, M.N., Cars, O., Derendorf, H. y Drusano, G.L. (2005) Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J. Antimicrob. Chemother.* **55**: 601–607.
- Mufson, M.A., Hao, J.B., Stanek, R.J. y Norton, N.B. (2012) Clinical features of patients with recurrent invasive *Streptococcus pneumoniae* disease. *Am. J. Med. Sci.* **343**: 303–309.
- Munoz, F.M., Hawkins, E.P., Bullard, D.C., Beaudet, A. L. y Kaplan, S.L. (1997) Host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae* is impaired in E-, P-, and E-/P-selectin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **100**: 2099–2106.
- Musher, D.M. (1992) Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 801–807.
- Nauseef, W.M. (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* **219**: 88–102.
- Nelson, D.C., Garbe, J. y Collin, M. (2011) Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes* – a potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. *Biol. Chem.* **392**: 1077–1088.

BIBLIOGRAFÍA

- Neufeld, F. (1900) Ueber eine spezifische bakteriolytische wirkung der galle. *Z. Hyg. Infektionskrankh.* **34**: 454–464.
- Nieto, C. y Espinosa, M. (2003) Construction of the mobilizable plasmid pMV158GFP, a derivative of pMV158 that carries the gene encoding the green fluorescent protein. *Plasmid* **49**: 281–285.
- Nishimura, Y., Shimojima, M., Tano, Y., Miyamura, T., Wakita, T. y Shimizu, H. (2009) Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat. Med.* **15**: 794–797.
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J. y Jenkinson, H.F. (2009) *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**: 407–450.
- Norcross, E.W., Sanders, M.E., Moore, Q.C., III. y Marquart, M.E. (2011) Pathogenesis of a clinical ocular strain of *Streptococcus pneumoniae* and the interaction of pneumolysin with corneal cells. *J. Bacteriol. Parasitol.* **2**: 108.
- Norman, K., Moore, K., McEver, R. y Ley, K. (1995) Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood* **86**: 4417–4421.
- Nuorti, J.P., Butler, J.C., Farley, M.M., Harrison, L.H., McGeer, A., Kolczak, M.S., *et al.* (2000) Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. *N. Engl. J. Med.* **342**: 681–689.
- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., *et al.* (2009) Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**: 893–902.
- Ogawa, Y., Ooka, T., Shi, F., Ogura, Y., Nakayama, K., Hayashi, T. y Shimoji, Y. (2011) The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *J. Bacteriol.* **193**: 2959–2971.
- Ogunniyi, A.D., Giammarinaro, P. y Paton, J.C. (2002) The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed in vivo. *Microbiology* **148**: 2045–2053.
- Ogunniyi, A.D., LeMessurier, K.S., Graham, R.M.A., Watt, J.M., Briles, D.E., Stroehrer, U.H. y Paton, J.C. (2007) Contributions of pneumolysin, pneumococcal surface protein A (PspA), and PspC to pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae* D39 in a mouse model. *Infect. Immun.* **75**: 1843–1851.
- Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Mahdi, L.K., Cook, J., Gordon, D.L., Sadlon, T.A. y Paton, J.C. (2009) Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn²⁺-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB J.* **23**: 731–738.
- Ogunniyi, A.D., Mahdi, L.K., Jennings, M.P., McEwan, A.G., McDevitt, C.A., Van der Hoek, M.B., *et al.* (2010) Central role of manganese in regulation of stress responses, physiology, and metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **192**: 4489–4497.
- Oldenburg, M., Krüger, A., Ferstl, R., Kaufmann, A., Nees, G., Sigmund, A., *et al.* (2012) TLR13 recognizes bacterial 23S rRNA devoid of erythromycin resistance-forming modification. *Science* **337**: 1111–1115.
- Oliver, J.M., Burg, D.L., Wilson, B.S., McLaughlin, J.L. y Geahlen, R.L. (1994) Inhibition of mast cell FcεR1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol. *J. Biol. Chem.* **269**: 29697–29703.
- Orihuela, C.J., Gao, G., Francis, K.P., Yu, J. y Tuomanen, E.I. (2004) Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J. Infect. Dis.* **190**: 1661–1669.
- Orth, D., Ehrlenbach, S., Brockmeyer, J., Khan, A.B., Huber, G., Karch, H., *et al.* (2010) EspP, a serine protease of enterohemorrhagic *Escherichia coli*, impairs complement activation by cleaving complement factors C3/C3b and C5. *Infect. Immun.* **78**: 4294–4301.
- Osler, W. (1910) *The Principles and Practice of Medicine*. 7th ed. D. Appleton and Co., New York and London.

- Palmer, T. y Berks, B.C. (2012) The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 483–496.
- Park, J., Choi, K.S. y Dumler, J.S. (2003) Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. *Infect. Immun.* **71**: 4018–4025.
- Park, I.H., Park, S., Hollingshead, S.K. y Nahm, M.H. (2007a) Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. *Infect. Immun.* **75**: 4482–4489.
- Park, I.H., Pritchard, D.G., Cartee, R., Brandao, A., Brandileone, M.C.C. y Nahm, M.H. (2007b) Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **45**: 1225–1233.
- Parsons, H.K. y Dockrell, D.H. (2002) The burden of invasive pneumococcal disease and the potential for reduction by immunisation. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **19**: 85–93.
- Pasteur (1881) Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull. Acad. Med. (Paris)* **10**: 94–103.
- Patel, P.B., Diaz, M.C.G., Bennett, J.E. y Attia, M.W. (2007) Clinical features of bacterial conjunctivitis in children. *Acad. Emerg. Med.* **14**: 1–5.
- Paton, J.C., Rowan-Kelly, B. y Ferrante, A. (1984) Activation of human complement by the pneumococcal toxin pneumolysin. *Infect. Immun.* **43**: 1085–1087.
- Paton, J.C., Andrew, P.W., Boulnois, G.J. y Mitchell T.J. (1993) Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 89–115.
- Pérez-Dorado, I., González, A., Morales, M., Sanles, R., Striker, W., Vollmer, W., *et al.* (2010) Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 576–581.
- Pérez-Dorado, I., Galan-Bartual, S. y Hermoso, J.A. (2012) Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol. Oral Microbiol.* **27**: 221–245.
- Pérez-Trallero, E., García-de-la-Fuente, C., García-Rey, C., Baquero, F., Aguilar, L., Dal-Ré, R., *et al.* (2005) Geographical and ecological analysis of resistance, coresistance, and coupled resistance to antimicrobials in respiratory pathogenic bacteria in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 1965–1972.
- Pérez-Trallero, E., Marimón, J.M., Ercibengoa, M., Giménez, M.J., Coronel, P. y Aguilar, L. (2007) Antimicrobial susceptibilities of amoxicillin-non-susceptible and susceptible isolates among penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**: 937–940.
- Picard, C., Casanova, J.-L. y Puel, A. (2011) Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α deficiency. *Clin. Microbiol. Rev.* **24**: 490–497.
- Pichichero, M.E., Kaur, R., Casey, J.R., Xu, Q., Almudevar, A. y Ochs, M. (2012) Antibody response to *Streptococcus pneumoniae* proteins PhtD, LytB, PcpA, PhtE and Ply after nasopharyngeal colonization and acute otitis media in children. *Hum. Vaccin. Immunother.* **8**: 799–805.
- Pilishvili, T., Lexau, C., Farley, M.M., Hadler, J., Harrison, L.H., Bennett, N.M., *et al.* (2010) Sustained reductions in invasive pneumococcal disease in the era of conjugate vaccine. *J. Infect. Dis.* **201**: 32–41.
- Piotrowska, H., Kucinska, M. y Murias, M. (2012) Biological activity of piceatannol: leaving the shadow of resveratrol. *Mutat. Res.* **750**: 60–82.
- Pomat, W.S., Lehmann, D., Sanders, R.C., Lewis, D.J., Wilson, J., Rogers, S. *et al.* (1994) Immunoglobulin G antibody responses to polyvalent pneumococcal vaccine in children in the highlands of Papua New Guinea. *Infect. Immun.* **62**: 1848–1853.
- Porat, N., Greenberg, D., Givon-Lavi, N., Shuval, D.S., Trefler, R., Segev, O., *et al.* (2006) The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J. Infect. Dis.* **194**: 689–696.

BIBLIOGRAFÍA

- Portugal, F. (2010) Oswald T. Avery: Nobel laureate or noble luminary? *Perspect. Biol. Med.* **53**: 558–570.
- Posfay-Barbe, K.M., Galetto-Lacour, A., Grillet, S., Ochs, M.M., Brookes, R.H., Kraehenbuhl, J.D., *et al.* (2011) Immunity to pneumococcal surface proteins in children with community-acquired pneumonia: a distinct pattern of responses to pneumococcal choline-binding protein A. *Clin. Microbiol. Infect.* **17**: 1232–1238.
- Potempa, J. y Pike, R.N. (2009) Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* **1**: 70–87.
- Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Bergmann, S., Rohde, M., Seiler, M., *et al.* (2005) PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect. Immun.* **73**: 2680–2689.
- Preston, J.A. y Dockrell, D.H. (2008) Virulence factors in pneumococcal respiratory pathogenesis. *Future Microbiol.* **3**: 205–221.
- Price, K.E. y Camilli, A. (2009) Pneumolysin localizes to the cell wall of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **191**: 2163–2168.
- Price, K.E., Greene, N.G. y Camilli, A. (2012) Export requirements of pneumolysin in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **194**: 3651–3660.
- Quin, L.R., Moore, Q.C. III y McDaniel, L.S. (2007a) Pneumolysin, PspA, and PspC contribute to pneumococcal evasion of early innate immune responses during bacteremia in mice. *Infect. Immun.* **75**: 2067–2070.
- Quin, L.R., Onwubiko, C., Moore, Q.C., Mills, M.F., McDaniel, L.S. y Carmicle, S. (2007b) Factor H binding to PspC of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to human cell lines in vitro and enhances invasion of mouse lungs in vivo. *Infect. Immun.* **75**: 4082–4087.
- Ram, S., Lewis, L.A. y Rice, P.A. (2010) Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 740–780.
- Rathinam, V.A.K., Vanaja, S.K. y Fitzgerald, K.A. (2012) Regulation of inflammasome signaling. *Nat. Immunol.* **13**: 333–342.
- Reichard, P. (2002) Oswald T. Avery and the Nobel prize in medicine. *J. Biol. Chem.* **277**: 13355–13362.
- Reichmann, N.T. y Gründling, A. (2011) Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum *Firmicutes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **319**: 97–105.
- Reichmann, P., Nuhn, M., Denapaite, D., Brückner, R., Henrich, B., Maurer, P., *et al.* (2011) Genome of *Streptococcus oralis* strain Uo5. *J. Bacteriol.* **193**: 2888–2889.
- Reinert, R.R., Jacobs, M.R. y Kaplan, S.L. (2010) Pneumococcal disease caused by serotype 19A: review of the literature and implications for future vaccine development. *Vaccine* **28**: 4249–4259.
- Rello, J., Lisboa, T., Luján, M., Gallego, M., Kee, C., Kay, I., *et al.* (2009) Severity of pneumococcal pneumonia associated with genomic bacterial load. *Chest* **136**: 832–840.
- Ribes, S., Ebert, S., Regen, T., Agarwal, A., Tauber, S.C., Czesnik, D., *et al.* (2010) Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia. *Infect. Immun.* **78**: 865–871.
- Rijneveld, A.W., Weijer, S., Florquin, S., Speelman, P., Shimizu, T., Ishii, S. y van der Poll, T. (2004) Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *J. Infect. Dis.* **189**: 711–716.
- Risitano, A.M. (2012) Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other complement-mediated hematological disorders. *Immunobiology* **217**: 1080–1087.
- Ritchie, N.D., Mitchell, T.J. y Evans, T.J. (2012) What is different about serotype 1 pneumococci? *Future Microbiol.* **7**: 33–46.

- Robinson, J.M. (2009) Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem. Cell Biol.* **131**: 465–469.
- Rodríguez-Cerrato, V., García, P., Huelves, L., García, E., del Prado, G., Gracia, M., *et al.* (2007) Pneumococcal LytA autolysin, a potent therapeutic agent in experimental peritonitis-sepsis caused by highly β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 3371–3373.
- Rodgers, F.G., Tzianabos, A.O. y Elliott, T.S.J. 1990. The effect of antibiotics that inhibit cell-wall, protein, and DNA synthesis on the growth and morphology of *Legionella pneumophila*. *J. Med. Microbiol.* **31**: 37–44.
- Romero-Steiner, S., Libutti, D., Pais, L.B., Dykes, J., Anderson, P., Whitin, J.C., *et al.* (1997) Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **4**: 415–422.
- Ronda, C., García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M. y López, R. (1987) Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur. J. Biochem.* **164**: 621–624.
- Ronda, C., García, J.L. y López, R. (1988) Characterization of genetic transformation in *Streptococcus oralis* NCTC 11427: expression of the pneumococcal amidase in *S. oralis* using a new shuttle vector. *Mol. Gen. Genet.* **215**: 53–57.
- Ronda, C., García, J.L. y López, R. (1991) Teichoic acid choline esterase, a novel hydrolytic activity in *Streptococcus oralis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **80**: 289–294.
- Rosenberger, C.M. y Finlay, B.B. (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**: 385–396.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortvist, A. y Masure, H.R. (1997) Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **25**: 819–829.
- Rubins, J.B., Charboneau, D., Paton, J.C., Mitchell, T.J., Andrew, P.W. y Janoff, E.N. (1995) Dual function of pneumolysin in the early pathogenesis of murine pneumococcal pneumonia. *J. Clin. Invest.* **95**: 142–150.
- Sahu, A. y Lambris, J.D. (2001) Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol. Rev.* **180**: 35–48.
- Salem, M., Seidelin, J.B., Rogler, G. y Nielsen, O.H. (2012) Muramyl dipeptide responsive pathways in Crohn's disease: from NOD2 and beyond. *Cell. Mol. Life Sci.* doi:10.1007/s00018-00012-01246-00014.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sánchez-Beato, A.R., López, R. y García, J.L. (1998) Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**: 207–214.
- Sánchez-Puelles, J.M., Ronda, C., García, J.L., García, P., López, R. y García, E. (1986) Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur. J. Biochem.* **158**: 289–293.
- Sanders, M.S., van Well, G.T., Ouburg, S., Lundberg, P.S., van Furth, A.M. y Morre, S.A. (2011) Single nucleotide polymorphisms in TLR9 are highly associated with susceptibility to bacterial meningitis in children. *Clin. Infect. Dis.* **52**: 475–480.
- Sato, K., Quartey, M.K., Liebler, C.L., Le, C.T. y Giebink, G.S. (1996) Roles of autolysin and pneumolysin in middle ear inflammation caused by a type 3 *Streptococcus pneumoniae* strain in the chinchilla otitis media model. *Infect. Immun.* **64**: 1140–1145.

BIBLIOGRAFÍA

- Saukkonen, K., Sande, S., Cioffe, C., Wolpe, S., Sherry, B., Cerami, A. y Tuomanen, E. (1990) The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram-positive meningitis. *J. Exp. Med.* **171**: 439–448.
- Schägger, H. y von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368–379.
- Schmeck, B., Huber, S., Moog, K., Zahlten, J., Hocke, A.C., Opitz, B., *et al.* (2006) Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- κ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**: L730–L737.
- Schmidt, S., Röck, K., Sahre, M., Burkhardt, O., Brunner, M., Lobmeyer, M.T. y Derendorf, H. (2008) Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**: 3995–4000.
- Schneewind, O. y Missiakas, D.M. (2012) Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **367**: 1123–1139.
- Schroder, K. y Tschopp, J. (2010) The inflammasomes. *Cell* **140**: 821–832.
- Schröder, N.W.J., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zähringer, U., *et al.* (2003) Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J. Biol. Chem.* **278**: 15587–15594.
- Schwaeble, W.J. y Reid, K.B.M. (1999) Does properdin crosslink the cellular and the humoral immune response? *Immunol. Today* **20**: 17–21.
- Sebert, M.E., Palmer, L.M., Rosenberg, M. y Weiser, J.N. (2002) Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect. Immun.* **70**: 4059–4067.
- Selva, L., Ciruela, P., Blanchette, K., del Amo, E., Pallares, R., Orihuela, C.J. y Muñoz-Almagro, C. (2012) Prevalence and clonal distribution of *pcpA*, *psrP* and *pilus-1* among pediatric isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* **7**: e41587.
- Seo, H.S., Cartee, R.T., Pritchard, D.G. y Nahm, M.H. (2008) A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologic inconsistencies of the current model. *J. Bacteriol.* **190**: 2379–2387.
- Serruto, D., Rappuoli, R., Scarselli, M., Gros, P. y van Strijp, J.A.G. (2010) Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 393–399.
- Severin, A., Severina, E. y Tomasz, A. (1997) Abnormal physiological properties and altered cell wall composition in *Streptococcus pneumoniae* grown in the presence of clavulanic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 504–510.
- Sevillano, D., Aguilar, L., Alou, L., Giménez, M.-J., González, N., Torrico, M., *et al.* 2008. High protein binding and cidal activity against penicillin-resistant *S. pneumoniae*: a cefditoren in vitro pharmacodynamic simulation. *PLoS One* **3**: e2717.
- Shahinas, D., Tamber, G.S., Arya, G., Wong, A., Lau, R., Jamieson, F., *et al.* (2011) Whole-genome sequence of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolate IS7493. *J. Bacteriol.* **193**: 6102–6103.
- Shimoi, Y. (2000) Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. *Microb. Infect.* **2**: 965–972.
- Short, K.R., Habets, M.N., Hermans, P.W.M. y Diavatopoulos, D.A. (2012) Interactions between *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus: a mutually beneficial relationship? *Future Microbiol.* **7**: 609–624.
- Siemieniuk, R.A., Gregson, D.B. y Gill, M.J. (2011) The persisting burden of invasive pneumococcal disease in HIV patients: an observational cohort study. *BMC Infect. Dis.* **11**: 314.

- Simell, B., Auranen, K., Käyhty, H., Goldblatt, D., Dagan, R. y O'Brien, K.L., for the Pneumococcal Carriage Group (PneumoCarr) (2012) The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev. Vaccines* **11**: 841–855.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V. y Sneath, P.H.A. (1980) Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 225–420.
- Skinner, J.M., Indrawati, L., Cannon, J., Blue, J., Winters, M., Macnair, J. *et al.* (2011) Pre-clinical evaluation of a 15-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV15-CRM197) in an infant-rhesus monkey immunogenicity model. *Vaccine* **29**: 8870–8876.
- Sorbara, M.T. y Philpott, D.J. (2011) Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol. Rev.* **241**: 40–60.
- Soriano, F., Cafini, F., Aguilar, L., Tarragó, D., Alou, L., Giménez, M.-J., *et al.* (2008) Breakthrough in penicillin resistance? *Streptococcus pneumoniae* isolates with penicillin/cefotaxime MICs of 16 mg/L and their genotypic and geographical relatedness. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 1234–1240.
- Spirig, T., Weiner, E.M. y Clubb, R.T. (2011) Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **82**: 1044–1059.
- Srivastava, A., Henneke, P., Visintin, A., Morse, S.C., Martin, V., Watkins, C., *et al.* (2005) The apoptotic response to pneumolysin is Toll-like receptor 4 dependent and protects against pneumococcal disease. *Infect. Immun.* **73**: 6479–6487.
- Standish, A.J. y Weiser, J.N. (2009) Human neutrophils kill *Streptococcus pneumoniae* via serine proteases. *J. Immunol.* **183**: 2602–2609.
- Stegenga, M.E., Florquin, S., de Vos, A.F. y van der Poll, T. (2009) The thiazolidinedione ciglitazone reduces bacterial outgrowth and early inflammation during *Streptococcus pneumoniae* pneumonia in mice. *Crit. Care Med.* **37**: 614–618.
- Sternberg, G.M. (1881) A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl. Board Health Bull.* **2**: 781–783.
- Stuart, L.M. y Ezekowitz, R.A.B. (2005) Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* **22**: 539–550.
- Stutz, A., Golenbock, D.T. y Latz, E. (2009) Inflammasomes: too big to miss. *J. Clin. Invest.* **119**: 3502–3511.
- Subrt, N., Mesak, L.R. y Davies, J. (2011) Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**: 979–984.
- Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M. y Chilvers, E.R. (2010) Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* **31**: 318–324.
- Sung, H., Shin, H.B., Kim, M.-N., Lee, K., Kim, E.-C., Song, W., *et al.* (2006) Vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 3524–3528.
- Sutcliffe, I.C. (2011) New insights into the distribution of WXG100 protein secretion systems. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**: 127–131.
- Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* **39**: 462–477.
- Tarragó, D., Lara, N., Fenoll, A., Casal, J., Giménez, M.J., Aguilar, L. y Sevillano, D. (2005) Specific antibodies, levofloxacin, and modulation of capsule-associated virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 3095–3096.
- Tedder, T. F., Steeber, D. A., Chen, A. y Engel, P. (1995) The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* **9**: 866–873.
- Teizo, F., Misao, M. y Yuichi, E. (2004) The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* **198**: 185–202.
- Terao, Y., Mori, Y., Yamaguchi, M., Shimizu, Y., Ooe, K., Hamada, S. y Kawabata, S. (2008) Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *J. Biol. Chem.* **283**: 6253–6260.

BIBLIOGRAFÍA

- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., *et al.* (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: 498–506.
- Thomas-Rudolph, D., Du Clos, T.W., Snapper, C.M. y Mold, C. (2007) C-reactive protein enhances immunity to *Streptococcus pneumoniae* by targeting uptake to Fc γ R on dendritic cells. *J. Immunol.* **178**: 7283–7291.
- Thornton, J.A., Durick-Eder, K. y Tuomanen, E.I. (2010) Pneumococcal pathogenesis: "innate invasion" yet organ-specific damage. *J. Mol. Med. (Berl.)* **88**: 103–107.
- Tilley, S.J., Orlova, E.V., Gilbert, R.J.C., Andrew, P.W. y Saibil, H.R. (2005) Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell* **121**: 247–256.
- To, H. y Nagai, S. (2007) Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**: 813–820.
- Tomasz, A. y Waks, S. (1975) Enzyme replacement in a bacterium: phenotypic correction by the experimental introduction of the wild type enzyme into a live enzyme defective mutant pneumococcus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 1311–1319.
- Tong, H.H., Blue, L.E., James, M.A. y DeMaria, T.F. (2000) Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect. Immun.* **68**: 921–924.
- Troese, M.J. y Carlyon, J.A. (2009) *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infect. Immun.* **77**: 4018–4027.
- Tweten, R.K. (2005) Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect. Immun.* **73**: 6199–6209.
- Uchiyama, S., Carlin, A.F., Khosravi, A., Weiman, S., Banerjee, A., Quach, D., *et al.* (2009) The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J. Exp. Med.* **206**: 1845–1852.
- Underhill, D.M. y Goodridge, H.S. (2012) Information processing during phagocytosis. *Nat. Rev. Immunol.* **12**: 492–502.
- UNICEF y WHO (2006) Pneumonia: the forgotten killer of children. http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf.
- Urban, C.F., Lourido, S. y Zychlinsky, A. (2006) How do microbes evade neutrophil killing? *Cell. Microbiol.* **8**: 1687–1696.
- Urzainqui, A., Serrador, J.M., Viedma, F., Yañez-Mó, M., Rodríguez, A., Corbi, A.L. *et al.* (2002) ITAM-based interaction of ERM proteins with Syk mediates signaling by the leukocyte adhesion receptor PSGL-1. *Immunity* **17**: 401–412.
- Urzainqui, A., Martínez del Hoyo, G., Lamana, A., de la Fuente, H., Barreiro, O., Olazabal, I.M., *et al.* (2007) Functional role of P-selectin glycoprotein ligand 1/P-selectin interaction in the generation of tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol.* **179**: 7457–7465.
- Vammen, B. (1939) Serological variants of pneumococcus types 9 and 10. *J. Immunol.* **37**: 359–365.
- van der Poll, T. y Opal, S.M. (2009) Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**: 1543–1556.
- van Ginkel, F.W., McGhee, J.R., Watt, J.M., Campos-Torres, A., Parish, L.A. y Briles, D.E. (2003) Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 14363–14367.
- van Rossum, A.M.C., Lysenko, E.S. y Weiser, J.N. (2005) Host and bacterial factors contributing to the clearance of colonization by *Streptococcus pneumoniae* in a murine model. *Infect. Immun.* **73**: 7718–7726.
- Verschoor, C.P., Puchta, A. y Bowdish, D.M.E. (2012) The macrophage. *Methods Mol. Biol.* **844**: 139–156.

- Vestweber, D. y Blanks, J. E. (1999) Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* **79**: 181–213.
- Vicente-Manzanares, M. y Sánchez-Madrid, F. (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 110–122.
- Voß, S., Gámez, G. y Hammerschmidt, S. (2012) Impact of pneumococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules on colonization. *Mol. Oral Microbiol.* **27**: 246–256.
- Vollmer, W. y Tomasz, A. (2001) Identification of the teichoic acid phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **39**: 1610–1622.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. y Foster, S. (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 259–286.
- von Moltke, J., Ayres, J.S., Kofoed, E.M., Chavarría-Smith, J. y Vance, R.E. (2013) Recognition of bacteria by inflammasomes. *Annu. Rev. Immunol.* **31**: 73–106.
- Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaebler, W.J. y Keeble, A.H. (2010) Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* **215**: 1–11.
- Walport, M.J. (2001a) Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* **344**: 1058–1066.
- Walport, M.J. (2001b) Complement. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* **344**: 1140–1144.
- Walker, J.A., Allen, R.L., Falmagne, P., Johnson, M.K y Boulnois, G.J. (1987) Molecular cloning, characterization, and complete nucleotide sequence of the gene for pneumolysin, the sulfhydryl-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **55**: 1184–1189.
- Wang, L. y Lin, M. (2008) A novel cell wall-anchored peptidoglycan hydrolase (autolysin), IspC, essential for *Listeria monocytogenes* virulence: genetic and proteomic analysis. *Microbiology* **154**: 1900–1913.
- Wang, X.-Y., Kilgore, P.E., Lim, K.A., Wang, S.-M., Lee, J., Deng, W., et al. (2011) Influenza and bacterial pathogen coinfections in the 20th century. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2011**: 146376.
- Wardlaw, T., Salama, P., Johansson, E.W. y Mason, E. (2006) Pneumonia: the leading killer of children. *Lancet* **368**: 1048–1050.
- Watson, D.A., Musher, D.M., Jacobson, J.W. y Verhoef, J. (1993) A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin. Infect. Dis.* **17**: 913–924.
- Wei, H. y Håvarstein, L.S. (2012) Fratricide is essential for efficient gene transfer between pneumococci in biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 5897–5905.
- Weinberger, D.M., Trzciński, K., Lu, Y.-J., Bogaert, D., Brandes, A., Galagan, J., et al. (2009) Pneumococcal capsular polysaccharide structure predicts serotype prevalence. *PLoS Pathog.* **5**: e1000476.
- Weinberger, D.M., Harboe, Z.B., Sanders, E.A.M., Ndiritu, M., Klugman, K.P., Rückinger, S., et al. (2010) Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* **51**: 692–699.
- Weidenmaier, C. y Peschel, A. (2008) Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 276–287.
- Weis, J.J., Law, S.K., Levine, R.P. y Cleary, P.P. (1985) Resistance to phagocytosis by group A streptococci: failure of deposited complement opsonins to interact with cellular receptors. *J. Immunol.* **134**: 500–505.
- Weiser, J.N., Bae, D., Fasching, C., Scamurra, R.W., Ratner, A.J. y Janoff, E.N. (2003) Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 4215–4220.
- Wellmer, A., Zysk, G., Gerber, J., Kunst, T., Von Mering, M., Bunkowski, S., et al. (2002) Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of *Streptococcus pneumoniae* in murine meningitis. *Infect. Immun.* **70**: 6504–6508.
- Weycker, D., Strutton, D., Edelsberg, J., Sato, R. y Jackson, L.A. (2010) Clinical and economic burden of pneumococcal disease in older US adults. *Vaccine* **28**: 4955–4960.

BIBLIOGRAFÍA

- White, B., Robinson, E.S. y Barnes, L.A. (1979) *The biology of pneumococcus: the bacteriological, biochemical, and immunological characters and activities of Diplococcus pneumoniae*. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Williams, P. (1987) Sub-MICs of cefuroxime and ciprofloxacin influence interaction of complement and immunoglobulins with *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 758–762.
- Witte, W. (1999) Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **44 Suppl A**: 1–9.
- Witzenrath, M., Gutbier, B., Hocke, A.C., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Berger, K., *et al.* (2006) Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit. Care Med.* **34**: 1947–1954.
- Wolfson, J.S. y Hooper, D.C. (1989) Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **2**: 378–424.
- Wong, A., Marrie, T.J., Garg, S., Kellner, J.D. y Tyrrell, G.J. (2010) Increased risk of invasive pneumococcal disease in haematological and solid-organ malignancies. *Epidemiol. Infect.* **138**: 1804–1810.
- Wright, A.E., Morgan, W.P., Colebrook, L.B. y Dogson, R.W. (1914a) Observations on prophylactic inoculations against pneumococcus infections, and on the results which have been achieved by it. *Lancet* **183**: 1–10.
- Wright, A.E., Morgan, W.P., Colebrook, L.B. y Dogson, R.W. (1914b) Observations on prophylactic inoculations against pneumococcus infections, and on the results which have been achieved by it. *Lancet* **183**: 87–95.
- Xu, Y., Ma, M., Ippolito, G.C., Schroeder, H.W., Jr, Carroll, M.C. y Volanakis, J.E. (2001) Complement activation in factor D-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14577–14582.
- Xu, Q., Kaur, R., Casey, J.R., Sabharwal, V., Pelton, S. y Pichichero, M.E. (2011) Nontypeable *Streptococcus pneumoniae* as an otopathogen. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **69**: 200–204.
- Yamada, M., Watanabe, T., Miyara, T., Baba, N., Saito, J., Takeuchi, Y. y Ohsawa, F. (2007) Crystal structure of cefditoren complexed with *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2X: structural basis for its high antimicrobial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 3902–3907.
- Yasuda, Y., Kasahara, K., Mizuno, F., Nishi, K., Mikasa, K. y Kita, E. (2007) Roxithromycin favorably modifies the initial phase of resistance against infection with macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a murine pneumonia model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**: 1741–1752.
- Yokota, S., Okabayashi, T., Yoto, Y., Hori, T., Tsutsumi, H. y Fujii, N. (2010) Fosfomicin suppresses RS-virus-induced *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* adhesion to respiratory epithelial cells via the platelet-activating factor receptor. *FEMS Microbiol. Lett.* **310**: 84–90.
- Yother, J. (2011) Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **65**: 563–581.
- Yuan, Z.Q., Lv, Z.Y., Gan, H.Q., Xian, M., Zhang, K.X., Mai, J.Y., *et al.* (2011) Intranasal immunization with autolysin (LytA) in mice model induced protection against five prevalent *Streptococcus pneumoniae* serotypes in China. *Immunol. Res.* **51**: 108–115.
- Yuste, J., Giménez, M.J., Jado, I., Fenoll, A., Aguilar, L. y Casal, J. (2001) Enhanced decrease of blood colony counts by specific anti-pneumococcal antibodies in the presence of sub-inhibitory concentrations of amoxicillin. *J. Antimicrob. Chemother.* **48**: 594–595.
- Yuste, J., Jado, I., Fenoll, A., Aguilar, L., Giménez, M.J. y Casal, J. (2002a) β -Lactam modification of the bacteraemic profile and its relationship with mortality in a pneumococcal mouse sepsis model. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**: 331–335.
- Yuste, J., Jado, I., Giménez, M.J., Aguilar, L., Molero, F., Fenoll, A. y Casal, J. (2002b) Modification of bacteraemia by specific antibodies and relation with mortality in a pneumococcal mouse sepsis model. *Clin. Exp. Immunol.* **128**: 411–415.

- Yuste, J., Botto, M., Paton, J.C., Holden, D.W. y Brown, J.S. (2005) Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J. Immunol.* **175**: 1813–1819.
- Yuste, J., Botto, M., Bottoms, S.E. y Brown, J.S. (2007) Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* **3**: e120.
- Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jönsson, G., Tay, L.-S., Hyams, C., *et al.* (2008) Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infect. Immun.* **76**: 3761–3770.
- Yuste, J., Khandavilli, S., Ansari, N., Muttardi, K., Ismail, L., Hyams, C., *et al.* (2010) The effects of PspC on complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae* vary with strain background and capsular serotype. *Infect. Immun.* **78**: 283–292.
- Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H. y Alexander, C. (2008) TLR2 – promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology* **213**: 205–224.
- Zarbock, A., Abram, C.L., Hundt, M., Altman, A., Lowell, C.A. y Ley, K. (2008) PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR γ to induce slow leukocyte rolling. *J. Exp. Med.* **205**: 2339–2347.
- Zartler, E.R., Porambo, R.J., Anderson, C.L., Chen, L.H., Yu, J. y Nahm, M.H. (2009) Structure of the capsular polysaccharide of pneumococcal serotype 11A reveals a novel acetylglycerol that is the structural basis for 11A subtypes. *J. Biol. Chem.* **284**: 7318–7329.
- Zhang, Z., Li, W., Frolet, C., Bao, R., di Guilmi, A.-M., Vernet, T. y Chen, Y. (2009) Structure of the choline-binding domain of Spr1274 in *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **65**: 757–761.

ANEXO

PUBLICACIONES DERIVADAS, HASTA LA FECHA, DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS EN ESTA TESIS

- Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., García, P., García, E. y Yuste, J. (2011) Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PloS One* **6**: e23626.
- Ramos-Sevillano, E., Rodríguez-Sosa, C., Cafini, F., Giménez, M.-J., Navarro, A., Sevillano, D., *et al.* (2012a) Cefditoren and ceftriaxone enhance complement-mediated immunity in the presence of specific antibodies against antibiotic-resistant pneumococcal strains. *PloS One* **7**: e44135.
- Ramos-Sevillano, E., Rodríguez-Sosa, C., Díez-Martínez, R., Giménez, M.-J., Olmedillas, E., García, P., *et al.* (2012b) Macrolides and β -lactams antibiotics enhance C3b deposition on the surface of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains by a LytA autolysin-dependent mechanism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**: 5534-5540.

