



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Tesis de Maestría en Biotecnología

DESARROLLO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LISADOS BACTERIANOS COMO INMUNOESTIMULANTES PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES RESPIRATORIAS

Lic. Florencia Ferrara Albano

Orientador: Dr. Alejandro Chabalgoity

Co-Orientador: Dra. Analía Rial

Departamento de
Desarrollo Biotecnológico
Instituto de Higiene · Facultad de Medicina



Resumen

Las infecciones del tracto respiratorio (ITRs) son las más frecuentes entre todas las infecciones humanas, presentando una alta morbilidad y mortalidad. La prevención y el tratamiento de las ITRs continúa siendo un desafío para la Salud Pública mundial, por lo que la inclusión de nuevas posibilidades terapéuticas es una preocupación vigente. La inmunoterapia basada en el uso de lisados bacterianos polivalentes fue introducida hace años para el tratamiento y/o prevención de las ITRs, y ha mostrado resultados alentadores en la clínica. Si bien en los últimos años se ha avanzado significativamente en cuanto a la elucidación de su mecanismo de acción, aún faltan por conocer intermediarios y mediadores específicos u otras vías paralelas de activación, que permitan establecer un mecanismo de acción universal para ellos. En este sentido, nos planteamos producir lisados bacterianos polivalentes en condiciones que sean escalables a la industria y caracterizar tanto su composición, como su actividad inmunoestimuladora, buscando contribuir al conocimiento actual sobre sus mecanismos de acción. En este trabajo se produjeron lisados bacterianos polivalentes mediante dos procesos de lisis, mecánica y alcalina, preparados a partir de cuatro cepas bacterianas involucradas en las ITRs. Se avanzó en la caracterización de los componentes de los lisados y se evaluó su actividad biológica mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los lisados bacterianos mostraron ser capaces de estimular células epiteliales, macrófagos y monocitos, iniciando rápidamente una respuesta pro-inflamatoria con la producción de citoquinas, quimioquinas y péptidos antimicrobianos. Además en el modelo murino, fueron capaces de generar una fuerte respuesta de resistencia frente a la infección letal por *S. pneumoniae*. Mediante ensayos de depleción de neutrófilos se mostró que a pesar de ser reclutados rápidamente, estos no son necesarios para conferir la protección. Por otro lado, tampoco la citoquina IL-17A ni la enzima Caspasa-1, ni la posible activación del inflamasoma, serían esenciales en esa respuesta. Por último se demostró que la fracción proteica de los lisados bacterianos no participa en la acción generada. Nuestros resultados sugieren en concordancia de lo publicado por otros autores, que las células epiteliales y la interacción por sus receptores celulares, principalmente los TLRs, y la respuesta pro-inflamatoria generada en el pulmón, serían claves en la respuesta de resistencia generada por los lisados bacterianos.

INDICE

Lista de Abreviaturas.....	5
I. INTRODUCCION	6
I.1. Inmunidad del Sistema Respiratorio	6
I.1.1. El pulmón y sus principales tipos celulares.....	6
I.1.2. Reconocimiento de los microorganismos.....	7
I.1.3. Respuesta inmune e inflamación.....	10
I.2. Infecciones del tracto respiratorio	11
I.2.1. Principales manifestaciones clínicas: Neumonía y EPOC	12
I.2.2. Etiología de las ITRs	12
I.3. Prevención y tratamiento de las ITRs	14
I.3.1. Uso de vacunas y sus limitantes	14
I.3.2. Uso de antibióticos y la generación de resistencia bacteriana	15
I.3.3. Alternativas terapéuticas: Inmunoterapia	16
I.4. Lisados bacterianos	16
II. OBJETIVOS.....	21
III. MATERIALES Y METODOS.....	22
III.1. Lisados bacterianos	22
III.1.1. Crecimiento y cultivo de las cepas bacterianas	22
III.1.2. Lisados bacterianos monovalentes.....	24
III.1.3. Lisados bacterianos polivalentes	26
III.1.4. Caracterización de los lisados bacterianos	26
III.2. Evaluación de la actividad biológica de los lisados bacterianos mediante ensayos <i>in vitro</i> ..	27
III.2.1. Ensayos de estimulación en una línea celular alveolar	27
III.2.2. Líneas celulares reporteras para la activación de NF- κ B y/o AP-1	28
III.3. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad biológica de los lisados bacterianos polivalentes	31
III.3.1. Animales.....	31
III.3.2. Vía de administración intranasal	31
III.3.3. Administración de los lisados polivalentes	31
III.3.4. <i>Streptococcus pneumoniae</i> serotipo 1.....	32
III.3.5. Necropsia y obtención de muestras	33
III.3.6. Ensayo de depleción de neutrófilos.....	34
III.4. Citometría de flujo.....	35
III.5. Extracción de ARN total y qRT-PCR.....	36
III.6. Análisis estadístico	37

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	38
IV.1. Producción de lisados bacterianos	38
IV.1.1. Desarrollo de procesos de lisis para cada cepa bacteriana	38
IV.1.2. Caracterización de los componentes de los lisados.....	42
IV.2. Evaluación de la actividad biológica de los lisados bacterianos mediante ensayos <i>in vitro</i> .47	
IV.2.1. Estimulación de la línea celular alveolar humana A549	47
IV.2.2. Líneas reporteras para la evaluación de la activación de NF-κB y/o AP-1 mediada por lisados bacterianos	50
IV.3. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad biológica de los lisados bacterianos polivalentes	58
IV.3.1. Puesta a punto del modelo murino como herramienta de trabajo en la evaluación de los lisados bacterianos	58
IV.3.2. Modelo de neumonía neumocócica	63
IV.3.3. Evaluación de los lisados polivalentes como tratamiento frente al desafío con <i>S. pneumoniae</i>	64
IV.3.4. Caracterización de poblaciones de células T presentes en pulmón luego del desafío ..	75
V. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES.....	80
VI. BIBLIOGRAFIA.....	85
Premios y publicaciones	95
Anexo 1	96
Anexo 2	97

Lista de Abreviaturas

ADNc: Ácido desoxirribonucleico copia
AP-1: Proteína activadora 1
ARNm: Ácido ribonucleico mensajero
BAL: Lavado broncoalveolar
Casp1^{-/-}: Ratones deficientes de Caspasa-1
DC: Célula dendrítica
EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
HCl: Ácido clorhídrico
Hib: *Haemophilus influenzae* tipo b
I.n.: intranasal
I.p.: intraperitoneal
Il17a^{-/-}: Ratones deficientes en Il17a
ITRs: Infecciones del Tracto Respiratorio
LBPA: Lisado Bacteriano Polivalente Alcalino
LBPM: Lisado Bacteriano Polivalente Mecánico
LPS: Lipopolisacárido
MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDL: Mínima Dosis Letal
MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NAC: Neumonía Adquirida en la Comunidad
NaOH: Hidróxido de Sodio
NF-kb: Factor nuclear-kappa B
NLRs: Receptores tipo NOD
NTHi: *Haemophilus influenzae* no tipificable
O.D.: Densidad óptica
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS: Buffer fosfato salino
Ply: Neumolisina
PRRs: Receptores de reconocimiento de patrones
RT-qPCR: Retrotranscripción- cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB: Suero Fetal Bovino
Sp: *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1
TLRs: Receptores tipo Toll
UFC: Unidades formadoras de colonias

I. INTRODUCCION

I.1. Inmunidad del Sistema Respiratorio

La superficie epitelial de las vías respiratorias representa una extensa área de aproximadamente 70 m² en un humano adulto, que está en continuo contacto con el medio exterior y por lo tanto, se encuentra expuesta a una amplia variedad de microorganismos durante la respiración [1]. Éstos incluyen microorganismos patógenos así como también microorganismos comensales (microbiota) que se encuentran normalmente colonizando las mucosas de las vías aéreas superiores: cavidades nasales, faringe y laringe. Si bien hasta hace pocos años se creía que las vías aéreas inferiores, espacios bronco alveolares y pulmón, permanecían estériles, hoy se sabe que existe una microbiota normal en ellos [2], [3]. La microbiota del pulmón influye en el desarrollo de enfermedades locales [4] y puede tener un impacto a nivel distal, por ejemplo, en la microbiota intestinal y viceversa [5]. Es importante destacar que este es un campo de investigación nuevo y aún queda mucho por saber de esta interacción [6]. El epitelio respiratorio es una barrera física y funcional, que colabora en el mantenimiento de la homeostasis, por un lado manteniendo bajo control la continua interacción entre la microbiota normal y los microorganismos patógenos, que ingresan por la vía aérea, y por otro lado, mediante la regulación de su función primordial: el intercambio gaseoso. Es la interacción entre todos los tipos celulares presentes, y la acción conjunta de la inmunidad innata y adaptativa, la responsable del mantenimiento de dicha homeostasis.

I.1.1. El pulmón y sus principales tipos celulares

El pulmón está compuesto por la vía aérea de conducción, recubierta por epitelio mucoso, y el parénquima pulmonar, que comprende los alvéolos especializados en el intercambio gaseoso. El epitelio alveolar está compuesto por dos tipos de células epiteliales, tipo I y II, que reconocen productos microbianos y secretan péptidos antimicrobianos, mucinas, productos de activación del complemento y proteínas surfactantes. Estos productos en

conjunto con el batido ciliar, son los primeros mecanismos de defensa frente a la entrada de microorganismos [1], [7], [8].

Las principales células efectoras en el pulmón son los macrófagos alveolares, células fagocíticas por excelencia, que corresponden al 90% de todas las células presentes en los alvéolos pulmonares. El resto lo componen células dendríticas (DC), *natural killer*, células T y células B. Las DC residentes en la mucosa respiratoria se encuentran posicionadas estratégicamente, para capturar y procesar antígenos y cumplen un rol vital [1], [8]. Es la acción conjunta de las células, tanto estructurales como residentes, que reconocen la entrada de microorganismos y desencadenan la respuesta inmune innata, generando así, la coordinación de la respuesta inmune [9].

I.1.2. Reconocimiento de los microorganismos

Las células reconocen la entrada de microorganismos a través de un diverso conjunto de receptores, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs). Estos receptores reconocen varios patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) compartidos por grandes grupos de microorganismos y también patrones asociados al daño endógeno (DAMPs). Se conocen varias clases de PRRs: TLRs (receptores tipo Toll), NLRs (receptores tipo NOD), RLRs (receptores tipo RIG-I), receptores de ADN citosólicos, entre otros. Estos PRRs pueden expresarse en la superficie celular o intracelular, en los endosomas, y pueden reconocer varios tipos de moléculas como proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos [9], [10]. La principal función de los PRRs incluye la activación de cascadas del complemento o la coagulación, fagocitosis y la activación de vías pro-inflamatorias de señalización [11].

TLRs

Los TLRs son considerados los principales sensores de patógenos y tienen un rol crítico en el control de las defensas de las vías respiratorias. Son glicoproteínas de membrana tipo I, compuestas por un dominio extracelular caracterizado por la presencia de repeticiones ricas en leucinas que rigen el reconocimiento de los ligandos y un dominio citoplasmático

TIR (receptor Toll/IL-1) requerido para la cascada de transducción de señales. Los TLRs funcionan como homodímeros, a excepción del TLR2 que se dimeriza con TLR1 o TLR6 con diferente especificidad de ligandos [11]. La ubicación de los TLRs y sus ligandos se muestran en la Tabla 1.

El reconocimiento de ligandos por parte de los TLRs desencadena vías de señalización (Figura 1), iniciando cambios conformacionales que permiten el reclutamiento de proteínas adaptadoras al dominio TIR del TLR activado. La proteína adaptadora usada por la mayoría de los TLRs es MyD88 (proteína de diferenciación de respuesta primaria mieloide). La vía de activación MyD88-dependiente inicia una extensa cascada de transducción de señales mediada por quinasas y factores de transcripción, que lleva a la activación del factor nuclear- κ B, NF- κ B. También activa la vía de las protein-quinasas activadas por mitógenos (MAPK), llevando a la translocación de AP-1 al núcleo. De esta manera esta cascada de señales induce la activación de genes involucrados en el control de sistema inmune, principalmente inflamatorios como quimioquinas y citoquinas, así como del ciclo celular, y del estrés celular. La proteína adaptadora TRIF es utilizada por TLR3 y de forma alternativa por TLR4. La vía TRIF-dependiente media la fosforilación de IRF3 llevando a la activación de genes de interferones tipo I (α y β) [10], [11].

NLRs

Los receptores NLRs son una familia de moléculas que reconocen un amplio espectro de ligandos en el citoplasma celular. Particularmente, NOD1 y NOD2, reconocen peptidoglicanos que componen la pared celular de las bacterias. Al reconocer los motivos bacterianos se inicia la activación de NF- κ B o MAPK, produciendo citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias.

La estimulación de diferentes tipos celulares, con PAMPs variados, provoca el inicio del ensamblaje del complejo multiproteico llamado inflamasoma, compuesto por integrantes de la familia de NLRs, y proteínas no-NLRs, como ser AIM2 y ASC. Este complejo proteico induce la activación de Caspasa-1, que inicia el clivaje proteolítico produciendo IL-1 β e IL-18 (Figura 1) [12], [13]. El inflamasoma NLRP3 es el más estudiado y es activado por

numerosos PAMPs bacterianos y virales, y DAMPs, aunque todavía no se conoce en detalle el mecanismo de acción por el cual los ligandos son reconocidos y los mecanismos de regulación involucrados en la respuesta frente a patógenos [14].

Tabla 1. Receptores tipo Toll (TLRs), su localización celular, los PAMPs que reconocen y las proteínas adaptadoras que utilizan.

TLRs	Localización celular	PAMPs que reconoce	Proteína adaptadora
TLR1	Superficie celular	Triacil-lipopetidos	MyD88
TLR2	Superficie celular	Di/triacil-lipopetidos, ácido lipoteicoico, peptidoglicano, glicolípidos, zymosan	MyD88/TIRAP
TLR3	Endosoma	dsRNA	TRIF
TLR4	Superficie celular	LPS	MyD88/TIRAP/TRIF/TRAM
TLR5	Superficie celular	Flagelina	MyD88
TLR6	Superficie celular	Diacil-lipopéptidos, ácido lipoteicoico	MyD88/TIRAP
TLR7	Endosoma	ssRNA	MyD88
TLR8	Endosoma	ssRNA	MyD88
TLR9	Endosoma	CpG, dsDNA	MyD88
TLR11	Endosoma	Profilina, flagelina	MyD88
TLR12	Endosoma	Profilina	MyD88
TLR13	Endosoma	23s rRNA	MyD88

Tomado y modificado de [15].

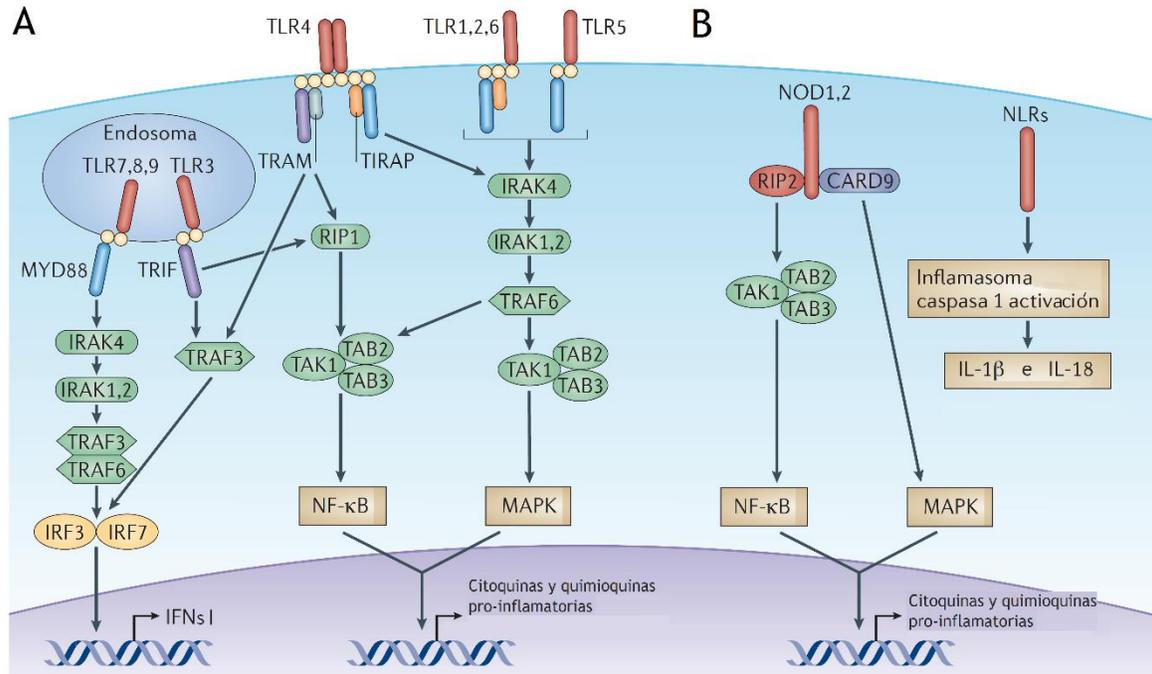


Figura 1. PRRs del sistema inmune innato y sus vías de señalización. Panel A) TLRs localizados en la superficie celular (TLR4, TLR1/2, TLR2/6 y TLR5) y en el endosoma (TLR7, TLR8, TLR9, TLR3) y sus vías de señalización. Al reconocer los PAMPs, los TLRs reclutan las proteínas adaptadoras (MyD88, TRIF, TRAM y TIRAP) y se inicia una cascada mediada por quinasas y factores de transcripción, que lleva a la activación de NF-κB y MAPK, produciendo citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias o Interferones tipo I. Panel B) Los NLRs presentes en el citosol, reconocen ligandos microbianos y activan las vías de NF-κB y MAPK. También activan Caspasa-1 y llevan a la formación del inflamasoma y el procesamiento de las proformas de IL-1β e IL-18. Imagen tomada y modificada de [16].

I.1.3. Respuesta inmune e inflamación

El reconocimiento de los antígenos microbianos a través de los PRRs modula la respuesta inmune en el pulmón: produce la liberación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias que son fundamentales para el reclutamiento de neutrófilos que provienen de la circulación sanguínea y para la maduración de las DC. Éstas, al capturar el antígeno adecuado y en presencia de estímulos pro-inflamatorios, comienzan su maduración y migran hacia los ganglios linfáticos regionales donde interactúan con células T vírgenes. Las células T activadas, se expanden y diferencian en linfocitos T que pueden migrar al

pulmón, con la ayuda de las quimioquinas pro-inflamatorias. Los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos podrán eliminar a las células afectadas, y los linfocitos T CD4⁺ Th1 podrán secretar citoquinas y colaborar en la diferenciación de células B a células plasmáticas, para la producción de anticuerpos contra el microorganismo patógeno. Los linfocitos T CD4⁺ con los estímulos adecuados, podrán diferenciarse en Th17, que secretan citoquinas como IL-17A/F e IL-22, y participan en la generación del ambiente pro-inflamatorio y en la eliminación del agente patógeno [1], [8], [17], [18].

De esta manera, con el aumento de la permeabilidad capilar y la migración de células fagocíticas al pulmón, se logra un ambiente inflamatorio, mientras se inicia la respuesta adaptativa. Este proceso debe ser contenido, para evitar la generación de una inflamación crónica que perjudique la función principal del pulmón, el intercambio gaseoso. Aquí se puede producir un balance de respuestas Th1/Th2, e iniciar una respuesta tolerogénica mediada por linfocitos T CD4⁺ Th2, y la producción de citoquinas como IL-10 o TGF- β induciendo la actividad de células T reguladoras (Treg) [1], [8].

El sistema inmune debe poner en acción y regular todos sus mecanismos para cumplir el rol vital de mantener la homeostasis en el sistema respiratorio. La pérdida de esta delicada regulación puede llevar al desarrollo de infecciones respiratorias [1].

I.2. Infecciones del tracto respiratorio

Las infecciones del tracto respiratorio (ITRs) son las más frecuentes entre todas las infecciones humanas, presentan una alta morbilidad y mortalidad, y constituyen un problema mundial muy importante que afecta a todos los rangos etarios, principalmente niños y adultos mayores [19]. Las ITRs incluyen todos los tipos de infecciones que involucran desde oídos y nariz, pasando por faringe y laringe (infecciones del tracto respiratorio alto) y que pueden funcionar como puerta de entrada a la tráquea, los bronquios y pulmón (infecciones del tracto respiratorio bajo) [20]. Estas últimas representan una de las principales causas de muerte entre todas las enfermedades infecciosas [19], siendo la enfermedad transmisible más mortal en el año 2015 [21]. Dentro de las ITRs bajas se incluyen la bronquitis aguda y crónica, las exacerbaciones

agudas del asma y la neumonía y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, siendo estas últimas las más letales.

I.2.1. Principales manifestaciones clínicas: Neumonía y EPOC

La neumonía es una forma aguda de las ITRs que afecta específicamente los pulmones causando inflamación del parénquima pulmonar, es de etiología infecciosa pudiendo ser causada por bacterias, virus u hongos. La neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es la neumonía más común y la principal causa de mortalidad infantil [22], siendo la responsable de casi 1.000.000 de muertes en niños menores de 5 años en el 2015 [23]. La NAC se diferencia de la neumonía intrahospitalaria y la que portan pacientes inmunodeprimidos, ya que en estos dos últimos casos influyen factores como la edad del paciente, la existencia de enfermedades asociadas o el lugar donde se adquiere la enfermedad [24], [25].

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad progresiva que puede ser fatal y se proyecta como la cuarta causa de muerte mundial para el 2030 [26]. Se caracteriza por la obstrucción de la función pulmonar causada por la reducción de la capacidad respiratoria y la inflamación de las vías aéreas, siendo el hábito de fumar un factor de riesgo [27]. Las exacerbaciones agudas del EPOC están asociadas en un 80% de los casos con agentes patógenos, principalmente bacterias y luego virus. La relación entre la carga bacteriana de los patógenos y la inflamación de las vías aéreas parece ser clave en las exacerbaciones. Además, la influencia que pueda tener la microbiota del pulmón en mediar la respuesta inflamatoria del huésped, puede tener consecuencias positivas y abrir un campo de oportunidades terapéuticas [28], [29].

I.2.2. Etiología de las ITRs

Los principales patógenos involucrados en las ITRs son *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Se estima que *S. pneumoniae* es responsable del 50% de los casos de neumonía y le sigue *H. influenzae*, con una frecuencia del 20%. Se encuentran también involucrados *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* y patógenos virales,

como Virus Respiratorio Sincitial e Influenza, en menor proporción [20]. *H. influenzae* es la principal especie involucrada en las exacerbaciones agudas en la EPOC, siguiéndole en ocurrencia *S. pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis* [30], [31].

***S. pneumoniae*, el principal agente etiológico**

La bacteria gram positiva *S. pneumoniae*, o neumococo, además de ser el principal responsable de la neumonía es una importante causa de otras patologías invasivas (meningitis, sepsis) y no invasivas (otitis media, rinitis y sinusitis)[32], siendo el patógeno humano que causa mayor morbi-mortalidad en el mundo [22]. *S. pneumoniae* es parte de la microbiota del tracto respiratorio alto, la colonización nasofaríngea es generalmente asintomática, pero es el paso inicial hacia la enfermedad y además constituye el reservorio natural de la bacteria. La alta frecuencia de colonización en los niños de hasta 5 años los hace el principal grupo de riesgo y a la vez el mayor vector de transmisión horizontal de la NAC [33]. Se reconocen más de 90 serotipos de *S. pneumoniae*, en base a la composición y estructura de su cápsula polisacáridica, siendo ésta su principal factor de virulencia y un determinante esencial para su antigenicidad. Tiene un rol central en la colonización e invasión de la bacteria, ya que evita el arrastre producido por el mucus, lo que le permite adherirse a la superficie epitelial [34], [35]. Otro factor clave está en su pared celular que tiene un componente inusual, la fosforilcolina (ChoP). Esta sirve de ancla para la unión no covalente de proteínas de unión a colina a la pared celular y es clave en la adhesión e invasión de las células hospederas, siendo un recurso también usado por otros patógenos respiratorios como *H. influenzae* [32], [34]. Neumococo también cuenta con su exotoxina, la neumolisina (Ply), una citolisina que forma poros y causa la lisis celular. Además Ply puede inducir la producción de quimioquinas y citoquinas y activar la inflamación. La autolisina LytA participa en la formación de poros para la liberación de Ply y provoca la degradación de las barreras celulares y endoteliales, favoreciendo así la diseminación de neumococo por el torrente sanguíneo [32], [34], [36].

***Haemophilus influenzae*, otro importante agente etiológico**

La bacteria gram negativa *H. influenzae*, al igual que *S. pneumoniae*, se encuentra exclusivamente en humanos. Las distintas cepas se clasifican según si poseen o no cápsula polisacáridica. Las cepas capsuladas del serotipo b, *H. influenzae* tipo b (Hib) causan generalmente infecciones invasivas, mientras que aquellas no capsuladas, conocidas como no tipificables (NTHi), normalmente colonizan el tracto aéreo superior, causando infecciones a nivel de mucosas [37], [38].

H. influenzae y *S. pneumoniae* comparten el nicho, la nasofaringe humana, y ambas son capaces de causar un espectro similar de enfermedades. La co-colonización de las dos especies es muy frecuente, superando el 50% de la población, especialmente en niños [39]. Se cree que el hecho de que compartan el nicho puede ser consecuencia de que utilicen mecanismos comunes para favorecer su colonización, tales como la expresión de ChoP, como se comentó. Se ha visto que la co-colonización reduce la diversidad neumocócica [40] y la prevalencia de otros patógenos frecuentes como *S. aureus*. Además aumenta la carga bacteriana y generalmente está asociada a enfermedades más severas que las que causarían los patógenos por sí solos [39], [41].

I.3. Prevención y tratamiento de las ITRs

I.3.1. Uso de vacunas y sus limitantes

Actualmente hay disponibles dos tipos de vacunas neumocócicas: la polisacáridica y las conjugadas. La polisacáridica (PPSV23) si bien protege contra la enfermedad neumocócica, no previene la colonización nasofaringe, y no es inmunogénica en niños menores de 2 años, justamente la principal población de riesgo [25], [42]. Las vacunas conjugadas donde los polisacáridos son unidos covalentemente a una proteína carrier, logran generar memoria inmunológica y prevenir la colonización nasofaríngea, siendo inmunogénicas en niños menores de 2 años [25], [42], [43]. La vacuna neumocócica conjugada (PCV13) se incorporó en 2010 en el esquema de vacunación nacional, e incluye

antígenos capsulares de 13 serotipos. El último reporte de la Organización Panamericana de la Salud muestra que los serotipos que prevalecen como causantes de enfermedades invasivas en Uruguay son el 3 y el 12F [44], esto revela un cambio notorio con respecto al informe anterior, donde el serotipo más frecuente era el 1 [45]. Así como ocurrió en Uruguay, varios estudios han mostrado que la vacunación regular con PCV13, ha provocado cambios en la distribución de los serotipos predominantes, disminuyendo los presentes en la vacuna, y aumentando la enfermedad invasiva por serotipos no presentes en la vacuna [46], [47]. Por otro lado, los anticuerpos generados por la vacuna restringen el acceso de los serotipos vacunales a las vías aéreas humanas, evitando su colonización. Esto genera un nicho que ahora está disponible para los serotipos no vacunales u otros patógenos respiratorios. También hay que tener en cuenta que la prevalencia de los serotipos difiere según la región geográfica y la edad del hospedero, lo que crea un problema en la formulación de vacunas que puedan proteger potencialmente a toda la población [32], [48].

En el caso de *H. influenzae*, las cepas de tipo b eran la causa más común de infección bacteriana invasiva y de meningitis en niños menores de 4 años a nivel mundial [49]. Luego de la implementación de la vacunación regular contra Hib, al igual que lo sucedido luego de la vacunación neumocócica, se produjo un reemplazo, volviéndose las cepas no tipificables las más predominantes en la infección invasiva [37], [38].

A pesar de que las vacunas conjugadas demostraron ser efectivas, no representan una solución definitiva en la prevención de las ITR. Por el contrario, conllevan a cambios en los patrones de colonización, generando composiciones no frecuentes en la microbiota respiratoria, lo que puede tener consecuencias inesperadas en los competidores y hasta la entrada de patógenos oportunistas, afectando la epidemiología de los patógenos involucrados y a la enfermedad infecciosa como tal. Como se expone, el uso de vacunas es limitado y parece impracticable el desarrollo de vacunas que cubran todo el espectro de patógenos involucrados.

I.3.2. Uso de antibióticos y la generación de resistencia bacteriana

Las guías que utiliza el cuerpo médico para el tratamiento de las ITRs no han cambiado en años [50]. El clásico tratamiento han sido los antibióticos, pero se ha vuelto inevitable la emergencia y diseminación de la resistencia bacteriana. Esto ha sido provocado por el uso innecesario de antibióticos de gran espectro en pacientes infectados con bacterias no resistentes y el uso inapropiado de antibióticos de primera línea en pacientes infectados con organismos resistentes [51]. El uso de los mismos está indicado solo cuando la infección bacteriana está causando daño tisular u obstrucción de las vías aéreas o se tiene un diagnóstico definido de neumonía o EPOC, ya que ha quedado demostrado que su uso indiscriminado favorece la resistencia antimicrobiana [50], [52]. Cabe destacar que la investigación de nuevos antimicrobianos ha disminuido y actualmente no hay nuevas clases o tipos de antibióticos disponibles que puedan ser testeados [50].

N I.3.3. Alternativas terapéuticas: Inmunoterapia

Con los años el conocimiento sobre la epidemiología de las infecciones respiratorias, y como actúa el sistema inmune, ha aumentado considerablemente, pero todavía la prevención y el tratamiento de las ITRs continúa siendo un desafío. La búsqueda de nuevas estrategias y alternativas sigue vigente y se vuelve esencial para lograr un mejor control de las infecciones respiratorias. El enfoque está en la búsqueda de tratamientos universales e independientes de serotipos, cepas o agentes infecciosos involucrados. Es aquí donde la inmunoterapia resulta una alternativa prometedora. El objetivo no es la destrucción del agente infeccioso, como en las terapias antimicrobianas, sino que consiste en explotar los mecanismos naturales de defensa por parte del huésped, ya sea iniciando o potenciando los mismos, induciendo la protección frente a un amplio espectro de patógenos [16].

I.4. Lisados bacterianos

La inmunoterapia basada en lisados bacterianos surgió en los años 70, para la prevención y tratamiento de las ITRs. Allí apareció el concepto de agentes bacterianos como inmunomoduladores, que tenían el potencial de evocar la respuesta inmune generada

frente a la entrada de un microorganismo patógeno, generando así varios efectos antimicrobianos [53]. Los lisados bacterianos están constituidos por diferentes especies bacterianas, en general, las principales involucradas en las ITRs [54]. Cada cepa bacteriana se crece de forma independiente, se cosecha e inactiva, y luego se lisa. La lisis celular es una etapa clave en la obtención de los lisados bacterianos y se han estudiado diferentes métodos, como la lisis con calor o detergentes, siendo los más utilizados, la lisis química o alcalina y la mecánica [53], [54]. Finalmente, cada cepa lisada se mezcla con las restantes cepas bacterianas, formando un lisado bacteriano polivalente, el cual en la industria farmacéutica, se formula con los excipientes requeridos según la presentación final (cápsulas, gotas o grajeas) y el tipo de administración (oral, intranasal o sublingual) [53], [55]. El mercado global de los lisados bacterianos es de gran magnitud y no solo para el tratamiento de las ITRs, también existen otras formulaciones, como por ejemplo las que se utilizan para el tratamiento de infecciones urinarias. En Uruguay, actualmente se encuentran disponibles para el tratamiento de las ITRs los siguientes lisados bacterianos comerciales: Ismibron® (Laboratorio Dispert, cápsulas orales), Ismigen® (Laboratorio Dispert, tabletas sublinguales) y posiblemente el más conocido, Broncho-Vaxom® (OM-85 BV, Laboratorio Pharma-OM), que se obtiene por la lisis química de ocho cepas de bacterias gram - y + y se administra por vía oral en cápsulas o polvo [56].

Varios ensayos clínicos han testeado los lisados bacterianos comerciales, evaluando poblaciones de niños y de adultos, obteniendo resultados alentadores. Se observó que los lisados bacterianos son efectivos en la prevención de las infecciones recurrentes tanto en niños, reduciendo los días de ausentismo escolar y el consumo de antibióticos [57]–[59], como en adultos, observándose una reducción de la incidencia y duración de la enfermedad [60], [61]. También se observó un efecto positivo en el tratamiento de pacientes con EPOC, reduciendo la incidencia, la duración y la severidad de las exacerbaciones [62]–[64]. Si bien el análisis de la literatura sugiere que el uso de lisados bacterianos representa una aproximación potencialmente efectiva y segura para tratar las ITRs, su uso continúa siendo materia de debate. A pesar de que los ensayos clínicos han revelado efectos muy positivos, aún se los cuestiona debido a que la mayoría de estos no

poseen un riguroso diseño experimental, con el número de pacientes adecuado y un diagnóstico definido, necesarios para lograr ensayos clínicos robustos [53].

Además, en estos últimos años se ha puesto el foco en comprender de manera detallada su mecanismo de acción, teniendo en cuenta las vías por la cual se administra, y lograr definir sus componentes individuales. Estos conocimientos, sin duda, ayudarán en su implementación como inmunoterapia para la prevención y tratamiento de las ITRs.

Mecanismo de acción

La base de acción de los lisados bacterianos es la estimulación de forma repetida del sistema inmune innato, activando diferentes vías y logrando así intensificar la respuesta inmune. Su actividad inmunoestimuladora posee la capacidad de imitar, o hasta cierta forma repetir, la respuesta inmune generada por la entrada de un patógeno al hospedero, siendo al principio no específica, pero logrando subsecuentemente que se vuelva específica [65]. A continuación se representan los mecanismos de acción y los efectos generados por la estimulación con los lisados bacterianos, que se han ido estableciendo (Figura 2).

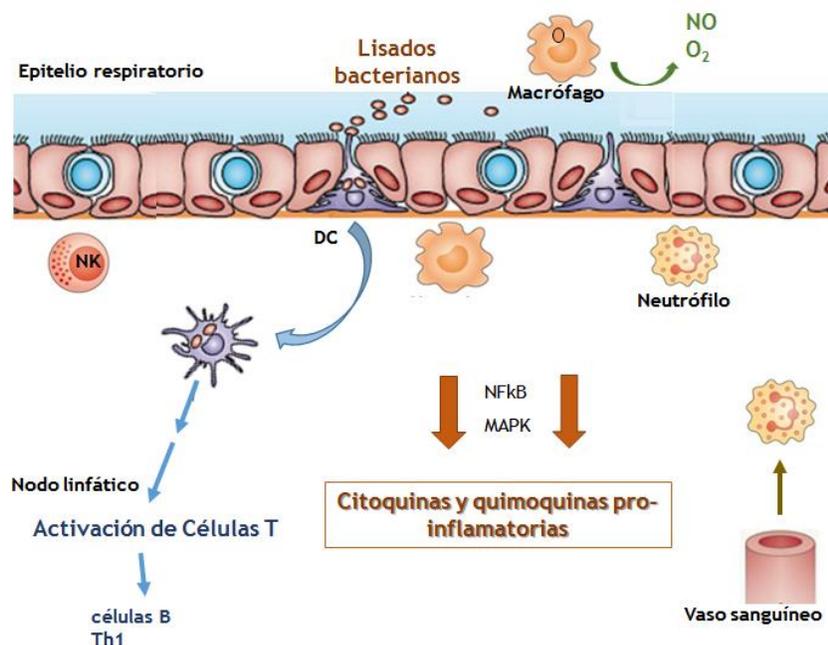


Figura 2. Esquema representativo de los mecanismos de acción de los lisados bacterianos al interactuar con el epitelio respiratorio y sus células tisulares y residentes. Los lisados bacterianos son reconocidos por los PRRs presentes en las células y desencadenan la activación de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias. Éstas, promoverán el reclutamiento de neutrófilos desde la circulación sanguínea. Los macrófagos además pueden fagocitar los componentes y liberar óxido nítrico (NO) y productos reactivos del O₂. Las células dendríticas (DC) capturan el antígeno y migran hacia el ganglio linfático, donde maduran y pueden activar células T vírgenes. Esquema elaborado a partir de imágenes tomadas y modificadas de *Nature Immunology*[®].

Los lisados bacterianos, a diferencia de las vacunas anteriormente mencionadas, se administran por vía oral, nasal o sublingual. Estas rutas activan la inmunidad de tejidos linfoides asociados a mucosas a nivel local y distal [53], [65]. La primera barrera a la que se enfrentan los lisados bacterianos son: células epiteliales, macrófagos y DCs que subyacen los tejidos. Estas células interactúan directamente con los lisados, principalmente mediante sus TLRs y así activan las vías de transducción de señales NF-κB y/o MAPK [66]–[69]. Esta activación resulta en la producción de intermediarios pro-inflamatorios como citoquinas (IL-1, IL-6, TNF-α) y quimioquinas (CXCL1, CXCL8, CCL20), que a su vez reclutan células efectoras y generan una respuesta inflamatoria aguda en pulmón [66], [68], [70]. Recientemente nuestro grupo de investigación mostró en un modelo murino, como esta inflamación se resolvía en 15 días [71]. Se ha demostrado que la interacción con los TLRs es fundamental para la generación de la respuesta inmune por parte de los lisados, ya que

genera un estado inmunológico de alerta que actúa frente a una posible infección [72]. Se ha visto que la interacción con los TLRs es dependiente de la proteína adaptadora MyD88 [73], [74] y se plantea que los principales TLRs involucrados son TLR2/6 y TLR9 [74].

Además, los macrófagos al activarse inducen la producción de óxido nítrico, que colabora en la generación de un ambiente microbicida [66]. Los lisados también interactúan con moléculas de adhesión y células natural killer [75].

Los lisados bacterianos inducen la maduración de las DCs, aumentando la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86 [76], que de esta forma son las primeras en presentar los antígenos bacterianos a las células T vírgenes [77]. En modelos murinos, se ha observado una regulación positiva del IFN- γ , indicando una orientación hacia una respuesta Th1 [66]. Las células Th1 ayudan a modular la respuesta de células B para diferenciarlas en células productoras de IgA con la producción de citoquinas como TGF- β o TNF- α . Luego, en conjunto migrarán, observándose altos niveles de IgA en saliva y mucosas, con capacidad de opsonización [78]–[80].

Trabajos a nivel pre-clínico han demostrado que la estimulación de la inmunidad innata con lisados bacterianos, resulta en una rápida activación de varias vías antimicrobianas en los pulmones, y está asociada a la protección frente al desafío contra diferentes bacterias e incluso virus, que causan las ITRs [67], [81], [82]. De esta manera aparece el término de resistencia innata [67], apoyando que es la estimulación de la inmunidad innata, la clave en la acción inmunoestimulante de los lisados bacterianos.

Si bien, en los últimos años se ha avanzado significativamente en cuanto a la elucidación del mecanismo de acción, aún falta por conocer intermediarios y mediadores específicos u otras vías paralelas de activación, que permitan establecer, un mecanismo de acción universal para ellos.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar procesos de producción de lisados bacterianos polivalentes, adecuados para su uso en humanos, caracterizarlos y evaluar su actividad inmunoestimuladora, como paso previo a su transferencia a la industria.

Objetivos específicos

1. Desarrollar procesos de producción, evaluando diferentes métodos de lisis celular y caracterizar los componentes de los lisados bacterianos polivalentes obtenidos.
2. Evaluar la actividad biológica de los lisados bacterianos en cultivos *in vitro* de líneas celulares humanas y murinas.
3. Evaluar su actividad biológica *in vivo* en un modelo murino, estudiando sus mecanismos de acción y su potencial uso terapéutico.

III. MATERIALES Y METODOS

III.1. Lisados bacterianos

III.1.1. Crecimiento y cultivo de las cepas bacterianas

En este trabajo se utilizaron cuatro cepas bacterianas (Tabla 2) para la producción de los lisados bacterianos. Estas cepas fueron previamente crecidas en medios adecuados, con los requerimientos de oxígeno necesarios según las características de cada cepa, y se guardaron alícuotas en medio de preservación a -80 °C, generando así los crioviales bacterianos de trabajo.

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas y sus características.

Bacteria	Cepa	Características
<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i>	Cepa: Seattle 1945 (ATCC® 25923™)	Gram + Anaerobio facultativo
<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	Cepa: PCI 602 (ATCC® 10031™)	Gram – Anaerobio facultativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Cepa: TIGR4 (Serotipo 4) (ATCC® BAA334™)	Gram + Anaerobio facultativo (puede depender de CO ₂)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Cepa: NCTC 4560 (no tipificable) (ATCC® 19418™)	Gram – Aerobio (crece como anaerobio facultativo)

Para el crecimiento de estas cepas, se buscaron medios con componentes definidos y que estos no fueran de origen animal, para que pudiera ser factible la producción y el escalado del bioproceso para el uso en humanos, en condiciones de buenas prácticas de manufactura (GMP). Para ello, se utilizaron medios de origen vegetal o sintético.

III.1.1.1. *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*

Para estas dos cepas se utilizó un medio vegetal, preparado tal como se describe en el Anexo I. En primer lugar, se realizó un cultivo *overnight* (o/n) en un matraz de 100 ml conteniendo 10 ml de medio, el cual fue inoculado con el stock bacteriano, mantenido a -80 °C, mediante raspado con tip estéril del criovial. Este cultivo se incubó por 12 hs a 37 °C con agitación, y luego se realizó una dilución 1/100, en volumen final 1 L y se incubó por 4 hs a 37 °C con agitación hasta alcanzar una densidad óptica (O.D.) a 600 nm de entre 1 y 1.2. Para cosechar la biomasa, se centrifugó todo el volumen de cultivo y el pellet bacteriano fue resuspendido en solución salina y conservado a -20 °C. Previamente se tomó una alícuota para el recuento bacteriano en placas LB agar. Se hicieron diluciones seriadas en solución salina, y se plaqueó en superficie, por triplicado. Las placas fueron incubadas a 37 °C o/n, y se contaron las UFC para obtener el valor de UFC/ml del cultivo original.

III.1.1.2. *Haemophilus influenzae*

Para esta cepa se utilizó el medio vegetal, preparado tal como se describe en el Anexo I. Se realizó un cultivo o/n en un tubo de 15 ml conteniendo 12 ml de medio, el cual fue inoculado mediante raspado con tip estéril del stock bacteriano de trabajo mantenido a -80 °C. Este cultivo se incubó por 12 hs a 37 °C con agitación, y luego se realizó una dilución 1/50, en volumen final 1 L y se incubó por 4 hs más a 37 °C con agitación. Se controló que la O.D. a 600 nm llegara a valores de entre 0.8 y 1. Se centrifugó el cultivo y el pellet bacteriano fue resuspendido en solución salina y conservado a -20 °C. Previamente se tomó una alícuota para el recuento bacteriano en placas agar chocolate (Agar Tripticosa Soja de Difco, complementado con 5% de sangre ovina estéril, previamente incubada a 80 °C por 10 minutos) enriquecidas con Hemina y NADH (8 mg/ml de cada uno). Se hicieron diluciones seriadas en solución salina, y se plaqueó en superficie, por triplicado. Las placas fueron incubadas o/n a 37 °C con 5% de CO₂, y se contaron para obtener el valor de UFC/ml del cultivo original.

III.1.1.3. *Streptococcus pneumoniae*

Para el cultivo de esta cepa, muy exigente a nivel nutricional, se utilizó un medio sintético definido que posee aminoácidos, vitaminas, sales y factores de crecimiento como se describe en Texeira *et al.*, 2015. Los componentes fueron pesados y preparados para un volumen final de 1 L de cultivo según las indicaciones [83]. Se cosechó la biomasa bacteriana, se centrifugó todo el volumen del cultivo y el pellet bacteriano se resuspendió en solución salina y se conservó a -20 °C. Previamente se tomó una alícuota para el recuento bacteriano en placas agar-sangre (Agar Tripticasa Soja de Difco, complementado con 5% de sangre ovina estéril). Se hicieron diluciones seriadas en solución salina, y se plaqueó en superficie, por triplicado. Las placas fueron incubadas o/n a 37 °C con 5% de CO₂, y se contaron para obtener el valor de UFC/ml del cultivo original.

III.1.2. Lisados bacterianos monovalentes

Para la obtención de los lisados monovalentes de cada cepa bacteriana de trabajo, se evaluaron dos métodos de lisis celular: alcalina y mecánica.

III.1.2.1. Lisis alcalina

Se evaluó el método de lisis por agregado de Hidróxido de Sodio (NaOH). La biomasa bacteriana resuspendida en solución salina (conservada a -20 °C) se inactivó por calor estableciendo que 10 minutos a 100 °C era un tiempo suficiente para eliminar todas las bacterias presentes (para confirmarlo se hicieron enriquecimientos bacterianos en caldos con los requerimientos de oxígeno adecuados para cada bacteria). En primer lugar, se realizó una cinética de lisis, a temperatura y pH controlados, a diferentes concentraciones de NaOH. Para ello la biomasa bacteriana se dividió en 3 partes y a cada una se le agregó NaOH para alcanzar las distintas concentraciones finales ensayadas (0.05, 0.1 y 0.2 M). Se incubó a 37 °C con agitación y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 2, 4 y 24 hs) que se evaluaron por análisis de geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE). Luego, como se observa en la Figura 3, se repite el proceso, utilizando las condiciones óptimas previamente determinadas. Se agregó ácido clorhídrico (HCl) en

cantidad equimolar para la neutralización del NaOH, se centrifugó (9000 rpm por 20 minutos), y se continuó el proceso con el sobrenadante. Este se lavó, filtró y concentró utilizando el equipo de filtración tangencial QuixStand (GE HealthCare) con una membrana de 30 kDa. Se colectó el “retenido” de 200 ml, correspondiente al lisado bacteriano.

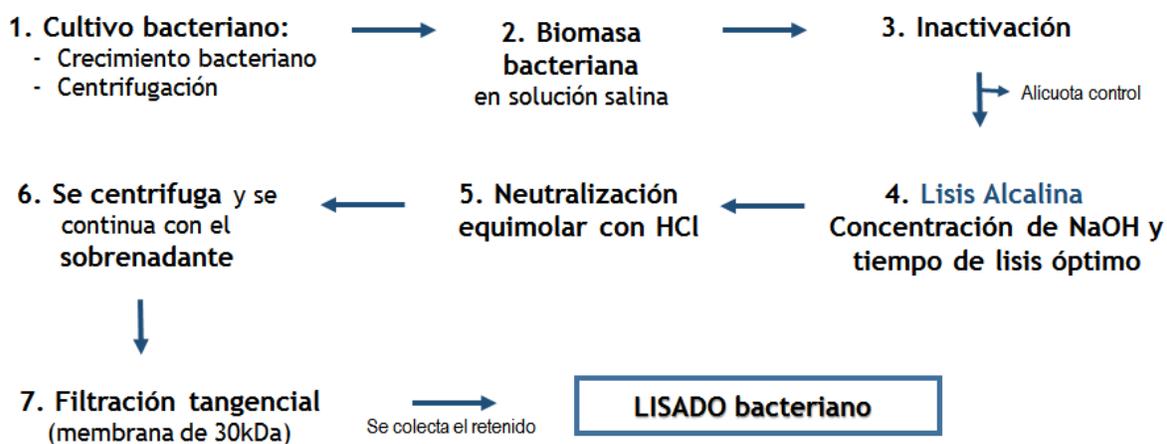


Figura 3. Esquema del proceso de lisis alcalina que fue puesto a punto y se empleó en la lisis de las cepas bacterianas de trabajo.

III.1.2.2. Lisis mecánica

Se realizó la lisis mecánica utilizando el equipo de disrupción celular mecánica EmulsiFlex - C3 Disruptor (Avestin, Inc.). La metodología (Figura 4) se puso a punto en colaboración con la Dra. Norma Suarez. Se evaluó la cantidad de pasajes sucesivos necesarios para obtener una lisis exitosa, buscando que en la fracción soluble se encuentren la mayor parte de las proteínas. Para esto, se analizaron los perfiles proteicos de las distintas fracciones obtenidas durante los pasajes mediante SDS-PAGE. La presión de homogeneización se ajustó entre 500 y 30000 psi. La biomasa bacteriana resuspendida en solución salina (conservada a -20 °C), se pasó a través del equipo, en fracciones de 100 ml. El lisado se colectó, se centrifugó (9000 rpm 20 minutos), y se conservó el sobrenadante. Durante el proceso se tomaron alícuotas y se realizaron enriquecimientos bacterianos en caldos adecuados para confirmar la inactivación bacteriana.

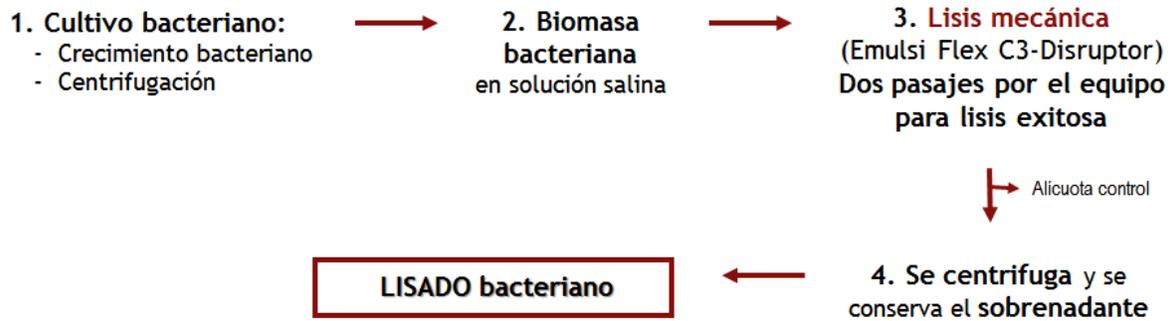


Figura 4. Esquema del proceso de lisis mecánica puesto a punto y empleado en la lisis de las cepas bacterianas de trabajo.

III.1.3. Lisados bacterianos polivalentes

Para preparar los lisados polivalentes se mezclaron cantidades iguales (250 µg de proteínas totales) de cada uno de los lisados bacterianos monovalentes. Se preparó el lisado bacteriano polivalente alcalino (LBPA) y el lisado bacteriano polivalente mecánico (LBPM), mezclando los lisados monovalentes obtenidos vía lisis alcalina o mecánica, respectivamente.

III.1.4. Caracterización de los lisados bacterianos

III.1.4.1. Caracterización por SDS-PAGE

Los lisados bacterianos se caracterizaron por SDS-PAGE, evaluando las distintas fracciones obtenidas durante el proceso, pellet y fracción soluble. Se hicieron geles de SDS-PAGE al 12%, y se utilizó el equipo Miniprotean IntraSystems (Biorad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.1.4.2. Caracterización por MALDI-TOF

Se utilizó el equipo Microflex LR MALDI-TOF (Bruker Daltonics). Para el análisis se mezcló 1 µl de cada lisado con 1 µl de la solución matriz (ácido sinapínico 10 mg/ml en H₂O con 1% de ácido trifluoroacético en proporciones 1:1). Esta mezcla fue colocada en una placa de acero inoxidable de 96 pocillos y se dejó 15 minutos a temperatura ambiente para su

posterior análisis. La medida se optimizó para el rango m/z de 0 a 20 kDa. Esta técnica fue puesta a punto por la Dra. Norma Suarez [84].

III.1.4.3. Cuantificación de carbohidratos

Se realizó la cuantificación de carbohidratos por el método de Fenol - Ácido Sulfúrico, utilizando una curva standard de glucosa [85]. En tubos de vidrio se mezclaron 150 µl de las muestras o del standard de glucosa (por triplicado) con 150 µl de fenol al 0.5% y 750 µl de ácido sulfúrico cc. Se incubaron a 100 °C en baño de aceite durante 15 minutos, y luego se determinó la absorbancia a 490 nm.

III.1.5. Tripsinización de los lisados bacterianos

Para evaluar si las proteínas son las responsables de la actividad biológica, se decidió realizar un control tripsinizando los lisados. Para ello, se mezclaron 2 volúmenes de lisado bacteriano con 1 volumen de Tripsina-EDTA al 0.017%. Se incubó la mezcla a 37 °C con agitación por 1 hora y luego se inactivó la tripsina por incubación a 70 °C durante 30 minutos. Se confirmó que la tripsinización fue efectiva por ausencia de proteínas en el análisis por SDS-PAGE.

III.2. Evaluación de la actividad biológica de los lisados bacterianos mediante ensayos *in vitro*

III.2.1. Ensayos de estimulación en una línea celular alveolar

La línea A549 (ATTC CCL-185), una línea epitelial de pulmón de origen humano, fue cultivada en medio Ham's F-12 (Capricorn) suplementado con SFB al 5% v/v, manteniéndose a menos del 80% de confluencia. En general, las células se despegaron utilizando Tripsina-EDTA por 3 minutos a 37 °C, luego se neutralizó su efecto con medio y se contaron las células en cámara de Neubauer con azul Trypan (Invitrogen).

Evaluación de la toxicidad de los lisados sobre la línea A549

Se evaluó la toxicidad de los lisados sobre las células A549 mediante ensayos de MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Para ello se sembraron 5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos. A las 24 hs se estimularon las células con los lisados bacterianos polivalentes (10 y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sembrando 10 réplicas de cada uno. Como control positivo se utilizó el agente citotóxico DMSO (dimetilsulfóxido) al 5%. A las 48 hs se retiró el medio, se agregó el MTT (5 mg/ml en PBS) y se incubó en estufa a 37 °C con 5% CO_2 por 1,5 hs. Finalizado el tiempo de incubación se agregaron 50 μl de SDS al 20% en agua miliQ, se incubó a temperatura ambiente por 6 hs y se realizó la lectura de absorbancia a 570 nm.

Ensayos de estimulación con los lisados polivalentes

Para los ensayos de estimulación, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de 2×10^5 células/pocillo y se incubaron por 24 hs para asegurar su adhesión. Luego, se estimularon con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LBPA o LBPM. Se realizó una cinética de estimulación a 6 tiempos: 1, 3, 6, 12, 24 y 48 hs. Para cada tiempo indicado, se removió el medio, se lavaron las células con PBS libre de Ca^{+2} y Mg^{+2} y se lisaron en TRIzol (Invitrogen) para posterior extracción del ARN total.

III.2.2. Líneas celulares reporteras para la activación de NF- κ B y/o AP-1

Se utilizaron líneas celulares reporteras que tienen integrado a su genoma, y expresan de forma estable, el gen reportero SEAP (*secreted embryonic alkaline phosphatase*). Estas líneas pueden expresar varios PRRs, como ser TLRs, NLRs, RIG o lectinas tipo C. La exposición frente a agonistas específicos de estos PRRs impulsa las vías de señalización produciendo la activación de NF- κ B y/o AP-1, que modula la actividad reportera induciendo la secreción de SEAP. Se evaluó la producción de proteína SEAP en los sobrenadantes celulares usando el sustrato QUANTI-Blue (Invivogen) y posterior lectura espectrofotométrica a 638 nm. Los resultados se expresaron como el incremento relativo respecto al control sin estimular. Se trabajó en estas líneas con los lisados bacterianos

monovalentes y polivalentes, a las concentraciones previamente ensayadas y que no resultaron tóxicas para las células, con el fin de evaluar su contribución en la señalización vía NF- κ B y/o AP-1.

III.2.2.1. RAW-Blue

Las células RAW-Blue (Invivogen) derivan de la línea de macrófagos murinos RAW 264.7 y tienen integrado en su genoma el reportero SEAP. Esta línea celular expresa todos los receptores tipo Toll (excepto TLR5), así como RIG-1, Dectina-1 y los receptores NOD-1 y NOD-2.

Estas células fueron cultivadas en medio DMEM con 4.5 g/l de glucosa (PAA) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Capricorn), 100 μ g/ml de Normocina (Invivogen) y 200 μ g/ml de Zeocina (Invivogen) como antibiótico selectivo, y se mantuvieron a menos del 80% de confluencia.

Para los ensayos de estimulación, las células se despegaron utilizando un “cell scraper”, y se contaron en cámara de Neubauer con azul Trypan. Se resuspendieron en un medio de análisis compuesto por DMEM con 4.5 g/l de glucosa suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 μ g/ml de Normocina y 10% (v/v) de SFB inactivado (30 minutos a 56 °C). En placas de 96 pocillos, se sembraron 1×10^5 células/pocillo en un volumen de 180 μ l y se agregaron 20 μ l de los diferentes lisados bacterianos monovalentes o polivalentes a concentraciones de 1-40 μ g/ml en PBS. Luego de 24 hs de incubación (a 37 °C con 5% de CO₂) se tomaron los sobrenadantes celulares, se adicionó el sustrato QUANTI-Blue y se determinó la absorbancia a 638 nm.

III.2.2.2. HEK-Blue mTLR4

Las células HEK-Blue mTLR4 (Invivogen) responden a la estimulación del receptor murino TLR4 (mTLR4). Derivan de la línea celular HEK293 y se obtuvieron co-transfectando el gen mTLR4, los co-receptores MD-2/CD14 y el reportero SEAP.

Estas células fueron cultivadas en DMEM con 4.5 g/l de glucosa suplementado con 2 mM de L-glutamina, 10% (v/v) de SFB, 100 μ g/ml de Normocina, Penicilina - Streptomina (50

U/ml - 50 µg/ml) y 1X de HEK Blue Selection (Invivogen), y se mantuvieron a menos del 80% de confluencia.

Para los ensayos de estimulación, las células se despegaron y se contaron en cámara de Neubauer con azul Trypan. En placas de 96 pocillos, se sembraron 180 µl a una concentración de 1.4×10^5 células/ml y se agregaron 20 µl de los lisados bacterianos polivalentes a concentraciones de 10 µg/ml en PBS. Luego de 24 hs de incubación (a 37 °C con 5% de CO₂) se tomaron los sobrenadantes celulares, se adicionó el QUANTI-Blue y se determinó la absorbancia a 638 nm.

III.2.2.3. THP1-XBlue

Las células THP1-XBlue (Invivogen) derivan de la línea de monocitos humanos THP1. Expresan todos los TLRs de superficie celular (los intracelulares son prácticamente indetectables) y NOD-1 y NOD-2.

Esta línea se cultivó en medio RPMI 1640 (PAA) suplementado con 2 mM de L-glutamina, 4.5 g/L glucosa, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sodio, 10% (v/v) de SFB inactivado, 100 µg/ml de Normocina, Penicilina - Streptomina (50 U/ml - 50 µg/ml) y 200 µg/ml de Zeocina como antibiótico selectivo. Las células se mantuvieron en una concentración menor a 2×10^6 células/ml. Para los ensayos de estimulación, las células se centrifugaron (5 minutos a 300 g), se resuspendieron en medio completo a 1×10^6 células/ml, y se sembraron 180 µl/pocillo en placa de 96 pocillos. Se sembraron 20 µl de los lisados bacterianos a concentraciones finales de 10 - 20 µg/ml y se incubaron por 24 hs a 37 °C con 5% de CO₂. Finalizado el tiempo de incubación se tomaron los sobrenadantes celulares, se adicionó el QUANTI-Blue y se realizó la lectura espectrofotométrica a 638 nm.

III.2.2.4. THP1-XBlue-defMyD

La línea reportera THP1-XBlue-defMyD (Invivogen) también deriva de la línea de monocitos humanos THP1. Esta línea celular tiene la particularidad de ser deficiente del adaptador celular MyD88, por lo que es incapaz de responder a la activación de receptores cuya señalización dependa de MyD88. Se mantiene inalterada la respuesta mediada por receptores independientes de MyD88, tales como NOD-1 y TNFR.

Estas células se cultivaron en el mismo medio descrito para THP1-XBlue con el agregado del antibiótico de selección Higromicina B Gold (100 µg/ml, Invivogen). Para el mantenimiento de la línea y los ensayos de estimulación se siguió el protocolo descrito para THP1-XBlue.

III.3. Evaluación *in vivo* de la actividad biológica de los lisados bacterianos polivalentes

III.3.1. Animales

Se utilizaron ratones hembras de 6 a 8 semanas de edad de las cepas C57BL/6, *Il17a*^{-/-}, *Casp1*^{-/-} y *Casp1*^{+/+}. Los ratones fueron suministrados por la División Nacional de Laboratorios Veterinarios o la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación del Instituto Pasteur de Montevideo. Los animales fueron mantenidos en el bioterio del Departamento de Desarrollo Biotecnológico en el Instituto de Higiene, en cajas ventiladas con aire filtrado, con agua y ración *ad libitum*. Los protocolos de los ensayos utilizados “Neumonía aguda en ratón causada por un aislado clínico de *S. pneumoniae*” y “Administración intranasal de compuestos para la evaluación de su actividad inmunopotenciadora en la mucosa respiratoria” fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) con el número de identificación 08-05-10.

III.3.2. Vía de administración intranasal

Los animales se anestesiaron con 111 mg de Ketamina y 5.6 mg de Xilacina por kg de peso mediante inyección intraperitoneal (i.p.) y se dejaron pasar 10 minutos para que la sedación fuera total. Con micropipeta se les administró el inóculo (de 30 a 50 µl) por vía intranasal (i.n.) de a gotas y en ambas narinas, manteniéndolos en posición vertical, por al menos 1 minuto, para que el mismo alcance los pulmones.

III.3.3. Administración de los lisados polivalentes

Los ratones fueron inoculados con los lisados polivalentes por vía i.n. como se describió anteriormente. Para ello se diluyó el LBPA o LBPM en solución salina estéril para lograr la concentración deseada, la cual fue puesta a punto ensayando concentraciones en un rango de 6 a 18 µg en 30 µl de inóculo.

III.3.4. *Streptococcus pneumoniae* serotipo 1

Se utilizó la cepa E1585 de *S. pneumoniae* de serotipo 1 que corresponde a un aislado clínico de sangre de un paciente con diagnóstico de neumonía. Esta cepa fue gentilmente cedida por la Dra. Teresa Camou del Departamento de Laboratorios de Salud Pública (M.S.P.) y ha sido ampliamente usada en el laboratorio [86], [87].

III.3.4.1. Preparación del inóculo

La cepa se cultivó en medio Todd Hewitt (Sigma) complementado con 0.5% de extracto de levadura (THYB) a 37 °C, hasta alcanzar una O.D de 0.7 - 0.9 a 600 nm. Las alícuotas se guardaron en medio de preservación a -80 °C, generando así el stock de trabajo.

Al momento de utilizar este inóculo bacteriano, la alícuota se descongeló rápidamente, se centrifugó (2500 g por 5 minutos) y se descartó el medio de preservación. El pellet bacteriano se lavó con 1 ml de solución salina estéril y se centrifugó en las mismas condiciones. Finalmente se resuspendió en solución salina estéril, en el volumen adecuado para administrar a los ratones la dosis requerida. En todos los casos, la concentración de bacterias viables fue verificada, mediante siembra de diluciones seriadas y recuento de UFC en placas agar-sangre incubadas por 18 hs a 37 °C con 5% de CO₂.

III.3.4.2. Infección con *S. pneumoniae* serotipo 1

La infección de *S. pneumoniae* fue realizada por vía intranasal, como ya se ha descrito, administrando el inóculo en un volumen final de 50 µl en solución salina estéril. La dosis administrada fue puesta a punto con el objetivo de que sea la mínima dosis letal, para lo cual se infectaron grupos de ratones con distintas dosis, evaluándose la sobrevivencia. La infección se realizó, en general, 24 hs después de la administración de los lisados

bacterianos. Tras la infección los animales se controlaron diariamente, registrándose el estado general y la supervivencia, por un máximo de 7 días. La manipulación de los animales infectados se realizó dentro de una cámara de flujo laminar (clase II A2, ESCO). La dosis infectiva del inóculo bacteriano se confirmó luego de realizar cada infección, realizando el recuento bacteriano en placas agar-sangre que se incubaron 18 hs a 37 °C con 5% de CO₂.

III.3.5. Necropsia y obtención de muestras

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y según cada caso, se extrajeron diferentes órganos, sangre y/o se realizaron lavados para ser utilizados en citometría de flujo, qPCR o para recuento de carga bacteriana, según se indica.

Pulmones

Antes de extraer los pulmones, se realizó la perfusión mediante inyección de PBS-EDTA 5 mM en el ventrículo derecho del corazón. El pulmón se conservó en 1 ml de medio RPMI en hielo, hasta su homogeneización para ser utilizado en citometría de flujo (ver sección III.4). En general, una porción se conservó en 500 µl de TRIzol e inmediatamente se guardó a - 80 °C hasta su procesamiento para el análisis por RT-qPCR (ver sección III.5.)

Bazos

Los bazos, fueron recuperados y colocados en 1 ml de solución salina estéril, manteniéndose en hielo hasta el momento de la homogeneización. Fueron disgregados usando un embolo estéril, y filtrados por filtros de 70 µm (BD). Luego se realizó el recuento bacteriano por plaqueo en agar-sangre.

Lavado nasofaríngeo (NAL)

Para realizar el NAL se hicieron cortes a ambos lados de la boca del ratón, de modo de exponer la cavidad nasofaríngea. Se introdujo una pipeta pasteur de punta fina (Fine Tip Pastette, Alpha Laboratories Ltda.) conteniendo 1 ml de solución salina estéril, que se hizo pasar a través de la cavidad, recogiendo el líquido que sale desde las narinas, el cual se mantuvo en hielo hasta su procesamiento. Para el recuento bacteriano se hicieron

diluciones seriadas, que fueron sembradas por triplicado en placas agar-sangre conteniendo gentamicina (5 µg/ml), para así evitar el crecimiento de otras bacterias α-hemolíticas de la microbiota de nasofaringe.

Lavado broncoalveolar (BAL)

Para el BAL, se utilizó una pipeta pasteur de punta fina con la que se realizaron lavados repetidos a través de la tráquea, con PBS-EDTA 5 mM o solución salina estéril, dependiendo si se utilizó para citometría de flujo o para recuento bacteriano respectivamente. En ambos casos, se conservó en hielo hasta su inmediato procesamiento.

Sangre periférica

La sangre, se extrajo por punción de la vena lateral de la cola, que se colectó mediante cánulas heparinizadas, para evitar su coagulación. Se conservó en hielo hasta su procesamiento para citometría de flujo, donde se centrifugó y marcó con los anticuerpos de interés.

III.3.6. Ensayo de depleción de neutrófilos

Con el objetivo de eliminar los neutrófilos circulantes, se usó un anticuerpo monoclonal dirigido contra la molécula de superficie conocida como Receptor de Granulocitos 1 (Gr1) expresado principal, pero no exclusivamente, en los neutrófilos. Se utilizó el anticuerpo monoclonal clon RB6-8C5, purificado a partir de sobrenadantes de cultivo de hibridomas (cedido gentilmente por el Dr. Sirard, Institut Pasteur de Lille, Francia). Se inyectaron vía i.p. 100 µg de RB6-8C5 en PBS. A las 12 hs se administró el LBPM y a las 24 hs se realizó el desafío con *S. pneumoniae*. Como control se empleó de igual forma un anticuerpo del mismo isotipo, IgG2b de rata, clon HB152 (también cedido por el Dr. Sirard). La eficacia del ensayo de depleción se comprobó mediante citometría de flujo empleando los

marcadores CD11b-PerCPCy5, Ly6C-FITC y Ly6G-APCCy7, confirmándose la depleción de los neutrófilos en sangre periférica.

III.4. Citometría de flujo

III.4.1. Procesamiento y análisis de pulmón y BAL

El pulmón se trató con colagenasa tipo I (Gibco, Life Technologies) y DNAsa I (Sigma) disgregando el tejido con tijera y pipeta pasteur, dejando incubar de 40 a 60 minutos a 37 °C con 5% CO₂. Luego la suspensión celular se pasó a través de filtros de 70 µm (BD), se centrifugó a 300 g por 5 minutos y se realizó la lisis de eritrocitos (Buffer LE, Qiagen). Luego se procedió al recuento de células viables con Trypan Blue.

En el caso de las muestras de BAL, las células fueron lavadas y luego se realizó el recuento celular. A continuación las células fueron marcadas, como se indica a continuación, con un panel de anticuerpos monoclonales (F4/80-FITC, Ly6G-PE, CD3-PE-Cy7, NK1.1 PerCP-Cy5, CD11c-APC, CD11b-APC-Cy7) para diferenciar las distintas poblaciones celulares de interés, siguiendo el protocolo general de marcado (III.4.2).

III.4.2. Protocolo general de marcado de anticuerpos

Se sembraron 1×10^6 células por tubo de citometría y se bloquearon los receptores Fc mediante incubación con 1 µl de Fc Block (BD) por 20 minutos a 4 °C. A continuación, se realizó el marcado con los anticuerpos monoclonales específicos (BD) por 30 minutos a 4°C y luego de los lavados, las células fueron fijadas con formaldehído al 4% y conservadas a 4°C en oscuridad hasta el momento de su adquisición. Las células se adquirieron y analizaron en un citómetro FACS Canto II (BD) utilizando el programa Facs Diva (BD).

III.4.3. Protocolo para marcar células T reguladoras

Se utilizó el kit Mouse Foxp3 buffer set (BD) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se preparó la suspensión celular de pulmón y se bloquearon los receptores Fc como se describió anteriormente. Se utilizaron los buffers específicos para el marcado y los lavados que incluye el kit. En primer lugar, se marcó con los anticuerpos monoclonales conjugados

para el marcado en superficie (CD3-PerCP, CD25-APC, CD4-APC-Cy7) y luego de realizar la fijación y permeabilización, se marcó con el anticuerpo específico para FoxP3 (FoxP3-PE) o con el control isotópico correspondiente. Dado que se realiza la marcación intranuclear que no es fijada, las células deben ser adquiridas inmediatamente.

III.5. Extracción de ARN total y qRT-PCR

Extracción de ARN

La extracción de ARN total se realizó a partir de células en cultivo o de porciones de pulmón, conservadas en TRIzol, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los pulmones se homogeneizaron usando el disruptor celular TissueRuptor (Qiagen) para luego seguir los pasos indicados de extracción con cloroformo, precipitación en alcohol isopropílico, lavado con etanol 75% v/v y solubilización en H₂O ultra pura incubándose a 60 °C durante 10 minutos. Luego se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos utilizando el Nanodrop (ThermoFisher Scientific) registrando el cociente de absorbancia 260/280 para determinar la pureza y calidad de la muestra.

Retrotranscripción

Se partió de 1 µg de ARN y en primer lugar se realizó el tratamiento con DNasa I (100 U, Invitrogen). Se agregaron 0,4 µl de la enzima en el buffer correspondiente, se dejó 15 minutos a temperatura ambiente, y se adicionó 1 µl de EDTA 25 mM (Invitrogen) dejándolo a 65 °C por 10 minutos.

Luego se realizó la retrotranscripción usando 1 µl de *random hexamers* (200 ng, Invitrogen), 1 µl de dNTPs (dinucleótidos trifosfatos 1 mM de cada tipo), 1 µl de RNasa Out (40 U/µl, Invitrogen), 2 µl de DTT 0.1 M (Invitrogen) y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (200 U/µl, Invitrogen) en buffer provisto por el fabricante. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Corbett CG1-96 con el programa: 10 min a 25 °C; 50 min a 37 °C; 15 min a 70 °C. El ADN copia (ADNc) fue diluido 1:5 con H₂O ultra pura (Invitrogen) para luego realizar la reacción de PCR en tiempo real (qPCR).

qPCR

La reacción de qPCR se realizó usando los primers específicos a una concentración de 1 μ M, 2 μ l de ADNc y 5 μ l de QuantiTect Sybr® Green (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La qPCR se llevó a cabo en el termociclador en tiempo real 7900 HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem). El ciclado usado fue de 15 minutos a 95° C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C; 1 minuto a 60 °C, y finalmente la disociación a 60 - 95 °C (aumentando 1 °C cada 5 segundos). El análisis de datos se realizó en el programa provisto por el fabricante.

Se utilizaron primers murinos y humanos (Anexo II) existentes en el laboratorio y se diseñaron, nuevos juegos de primers en particular para amplificación de péptidos antimicrobianos. Para el diseño se utilizó la herramienta Primer Blast del “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI) y se usó el programa OligoAnalyzer 3.1 de “*Integrated DNA Technologies*” para analizar las temperaturas de melting y evaluar la posible formación de dímeros.

III.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc). Se empleó el test de ANOVA de una vía para la comparación de medias entre grupos y ANOVA de dos vías, con la corrección de Bonferroni, para la comparación de medias entre grupos y a distintos tiempos. Las curvas de sobrevida de Kaplan-Meier se analizaron por el test de log rank (Mantel-Cox).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

IV.1. Producción de lisados bacterianos

IV.1.1. Desarrollo de procesos de lisis para cada cepa bacteriana

La obtención de lisados bacterianos implica la ruptura de la estructura bacteriana y la liberación de los componentes intracelulares al medio, lo que puede realizarse mediante métodos químicos o físicos. En este trabajo se desarrollaron y pusieron a punto dos procesos para la obtención de lisados bacterianos, uno mediante lisis alcalina y otro mediante disrupción celular mecánica. La producción de los lisados bacterianos se basó en el perfil proteico para establecer las condiciones óptimas de lisis, lo cual brindó una buena aproximación para la estandarización de los procesos.

En el caso de la lisis alcalina se realizó en primer lugar, una cinética de lisis, a temperatura y pH controlados, a diferentes concentraciones de NaOH, para cada cepa bacteriana. Mediante el análisis por SDS-PAGE de cada punto de la cinética, se eligieron las condiciones óptimas para cada cepa (Tabla 3). En la Figura 5 se muestran a modo de ejemplo los resultados obtenidos para el caso de *K. pneumoniae*. Una vez establecidas las condiciones óptimas, se siguió el esquema de trabajo puesto a punto (III.1.2, Figura 3) y se realizaron varios lotes de los lisados alcalinos de cada una de las cuatro cepas bacterianas de trabajo: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*.

En el caso de la lisis mecánica, el cultivo bacteriano se pasó por el equipo de disrupción celular, y se evaluó la cantidad de pasajes sucesivos necesarios para obtener una lisis exitosa. Para esto se analizaron mediante SDS-PAGE los perfiles proteicos de las distintas fracciones celulares obtenidas durante los pasajes, separando sobrenadante y pellet. Se determinó que dos pasajes por el equipo eran suficientes para lograr una lisis exitosa, donde la mayor cantidad de proteínas estuviera en la fracción soluble (sobrenadante celular). A modo de ejemplo, se muestran los resultados obtenidos en el caso de *H. influenzae* (Figura 6). Nuevamente, establecidas las condiciones óptimas, se siguió el

esquema de trabajo (III.1.2, Figura 4) y se realizaron varios lotes de lisados mecánicos de cada una de las cuatro cepas bacterianas de trabajo.

De esta manera, se obtuvieron lisados monovalentes alcalinos y mecánicos de cada cepa de trabajo, que luego se mezclaron formando los lisados polivalentes alcalino y mecánico (LBPA y LPBM, respectivamente).

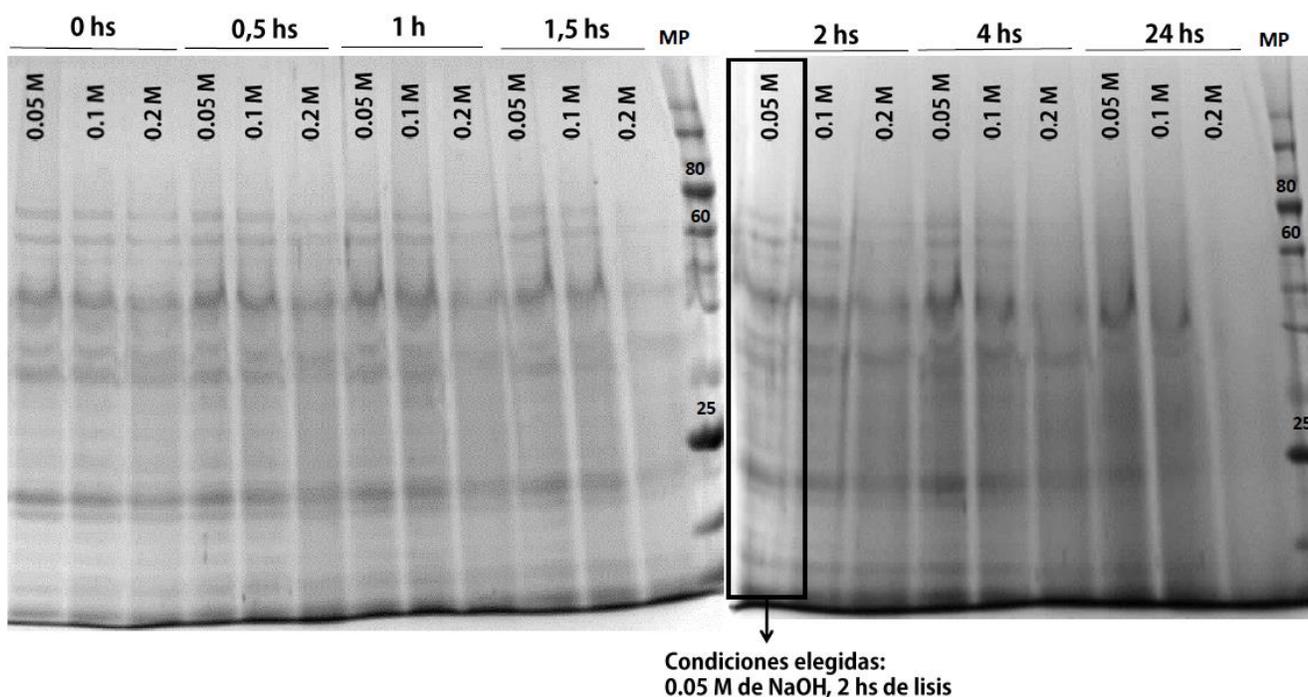


Figura 5. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas durante la cinética de lisis alcalina de un cultivo de *Klebsiella pneumoniae*. En cada carril se indica la concentración de NaOH y en las barras superiores, el tiempo de lisis de cada fracción. En el recuadro se muestran las condiciones de lisis óptimas elegidas para esta cepa, 0.05 M de NaOH y 2 hs de incubación. Se utilizó un marcador proteico (MP) de 10 - 250 kDa (BioLabs).

Tabla 3. Concentración de NaOH y tiempo de lisis, requeridos para la lisis alcalina de cada cepa bacteriana.

Cepa bacteriana	[NaOH] (M)	Tiempo de lisis (hs)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.1	1.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.05	2
<i>Haemophilus influenzae</i>	0.05	0.75
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.05	1.5

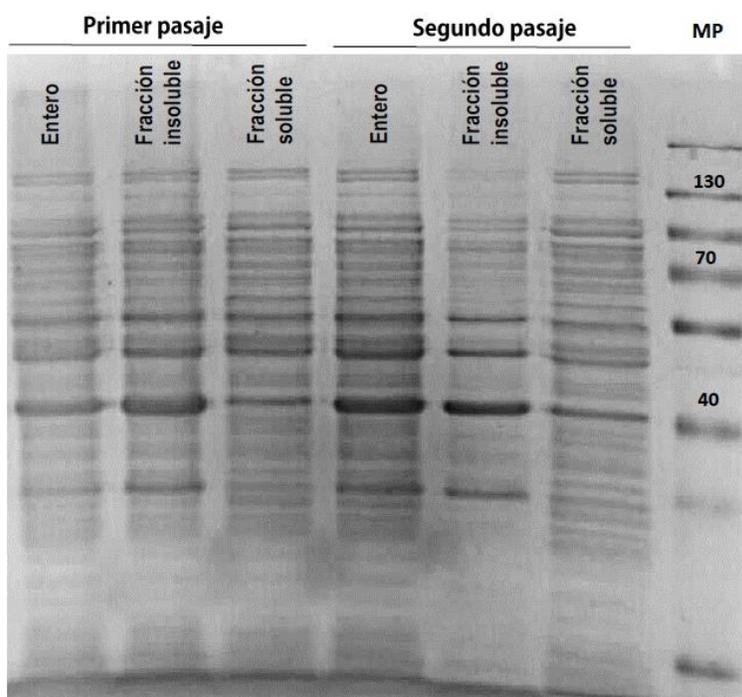


Figura 6. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas de la lisis mecánica de *Haemophilus influenzae*. El cultivo se pasó por el equipo y se tomaron alícuotas de cada pasaje. En la figura se indica la cantidad de pasajes por el equipo y la fracción sembrada, el entero (la muestra total sin centrifugar), la fracción insoluble (pellet) o la soluble (sobrenadante), para saber en cuál de estas se encuentran la mayor parte de las proteínas. Se utilizó un marcador proteico (MP) de 10 - 230 kDa (Thermo).

Como se comentó anteriormente, las cepas bacterianas fueron crecidas en medios vegetales o sintéticos (III.1.1), evitando componentes de origen animal. Esto es importante para la reproducibilidad a escalas mayores, pensando en un producto que pueda ser adecuado para su uso en humanos y siguiendo las normas GMP.

En cuanto a la producción de los lisados, en el caso del proceso alcalino, la parte crítica fue el análisis por SDS-PAGE de la cinética de lisis. Establecimos que buscábamos tres condiciones: un perfil de proteínas abundante, con todas sus bandas definidas y que no mostrara indicios de degradación. Al tiempo y concentración de NaOH que se cumplieran estas tres pautas, se estableció como óptimo, para cada cepa bacteriana. En nuestro caso, los tiempos que produjeron una lisis exitosa fueron cortos, aunque las referencias indicaban que se necesitarían incubaciones prolongadas, observamos que a tiempos largos la degradación era total. Cabe destacar que durante el proceso de lisis el pH se controló y fue mayor a 10 en todos los casos, lo cual es vital para el aseguramiento de una lisis alcalina exitosa [88]. La desventaja de la lisis alcalina es que la utilización de NaOH y luego de HCl para detener y neutralizar la solución, provoca la producción de sales NaCl que deben ser eliminadas, para lo cual se usó la filtración tangencial. Aquí aparece otro problema y es el control y ajuste de los parámetros mientras se realiza el proceso de filtración. Por esto fue importante la puesta a punto para cada cepa, para lograr estandarizar el proceso y disminuir las variables, logrando una buena reproducibilidad.

El proceso mecánico incluyó la puesta a punto de la presión del equipo de disrupción celular, donde radicó la mayor dificultad, ya que fue necesario estandarizar y ajustar las variables del equipo. Pero una vez logrado, el proceso de lisis y la reproducibilidad del mismo resultó confiable y exitoso. Al evitar procesos químicos, cuando la membrana celular se rompe y libera los componentes al medio, simplemente mediante la centrifugación se logra separar del debris y restos celulares, la parte soluble que es la de interés.

IV.1.2. Caracterización de los componentes de los lisados

La caracterización de los lisados se realizó evaluando el contenido de carbohidratos y de proteínas presentes en los mismos.

IV.1.2.1. Caracterización del contenido de carbohidratos

Los lisados fueron caracterizados a nivel de contenido total de azúcares por el método de Fenol - Ácido Sulfúrico. Los lisados mecánicos de todas las cepas fueron los que presentaron una mayor concentración (Tabla 4).

IV.1.2.2. Caracterización del contenido de proteínas

Los lisados se caracterizaron a nivel proteico, cuantificando su contenido de proteínas totales por el método de BCA y analizando sus perfiles proteicos por SDS-PAGE y MALDI-TOF. Para todas las cepas bacterianas, el lisado mecánico presentó mayor concentración proteica, en comparación con su respectivo lisado alcalino (Tabla 4). Asimismo, se observó por SDS-PAGE, que los lisados mecánicos mostraron perfiles mucho más definidos y con una mayor cantidad de proteínas en comparación con los alcalinos (Figura 7). En el análisis por MALDI-TOF se observó que los lisados mecánicos presentaron más proteínas identificables y con una intensidad mayor. También cabe destacar que los lisados alcalinos mostraron mayor ruido y menor nitidez que los mecánicos (Figura 8). El MALDI-TOF permitió identificar, para cada lisado, posibles proteínas marcadoras que permitan caracterizar en forma reproducible cada uno de los distintos lotes.

Tabla 4. Concentración de proteínas y carbohidratos de los lisados bacterianos obtenidos por lisis alcalina y mecánica. Los datos representan la media de n=3 réplicas ± el desvío standard (S.D.)

	Proteínas totales (mg/ml)		Carbohidratos (mg/ml)	
	Alcalino	Mecánico	Alcalino	Mecánico
<i>S. aureus</i>	0.21 ± 0.00	0.51 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.49 ± 0.06
<i>K. pneumoniae</i>	1.02 ± 0.01	1.29 ± 0.02	0.30 ± 0.04	0.40 ± 0.01
<i>S. pneumoniae</i>	0.18 ± 0.00	0.41 ± 0.01	0.71 ± 0.09	0.70 ± 0.05
<i>H. influenzae</i>	0.24 ± 0.00	0.49 ± 0.01	0.08 ± 0.04	0.18 ± 0.09
Lisado polivalente	0.22 ± 0.01	0.59 ± 0.01	0.20 ± 0.00	0.46 ± 0.01

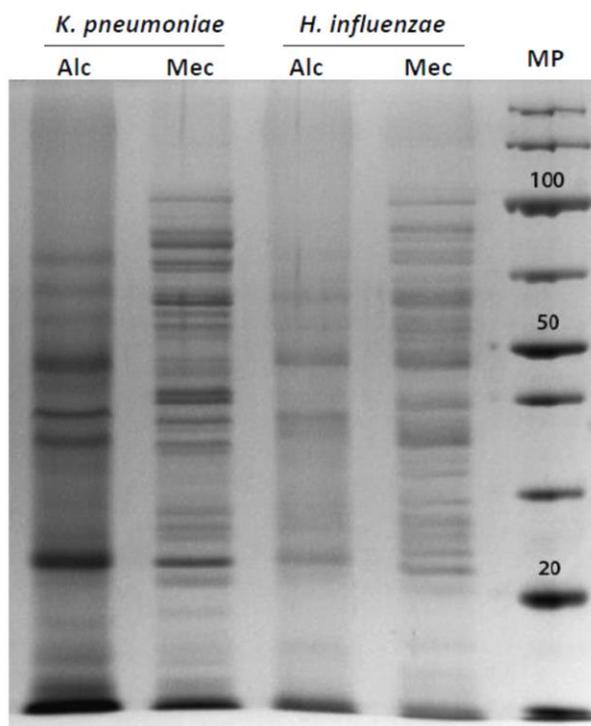


Figura 7. Análisis por SDS-PAGE de los lisados bacterianos alcalinos y mecánicos. Se sembraron 5 µg de cada uno por carril. Se observan los lisados alcalino (Alc) y mecánico (Mec) de *K. pneumoniae* y de *H. influenzae*, respectivamente. Se utilizó un marcador proteico (MP) de 5 - 250 kDa (Thermo).

Los resultados de la caracterización proteica sugieren que el proceso de lisis mecánica preserva mejor las proteínas. El proceso químico por el cual se obtuvieron los lisados alcalinos, puede modificar la estructura proteica provocando su desnaturalización, tal como ha sido sugerido por otros [53], [55], [89]. Se puede observar en la Figura 7, que los patrones de SDS-PAGE para lisados de una misma cepa bacteriana no son iguales, donde hay bandas que aparecen en el alcalino pero no en el mecánico. Esto indica diferencias en el resultado final de cada proceso de lisis, sugiriendo que se extraen diferentes componentes durante los procesos o que podría ocurrir una modificación de la estructura proteica en el proceso alcalino. Por el contrario, los lisados mecánicos poseen un perfil abundante de proteínas y con bandas bien definidas, lo que descarta la degradación. Se ha mencionado incluso, que puede ocurrir una racemización de los aminoácidos (AA), que modifica, por lo menos de forma parcial, los L-AA en D-AA. También se ha sugerido que estos podrían ser beneficiosos por no existir de forma natural en los mamíferos y así aumentar su biodisponibilidad en el organismo [88].

En este sentido, también se pueden ver afectados por el proceso químico los azúcares presentes en las bacterias. Durante a lisis alcalina los azúcares pueden ser modificados, clivados en estructuras de menor tamaño y hasta sustituidos por otros grupos químicos [88]. Aunque aquí no se realizó un análisis estructural, se observó que todos los lisados mecánicos presentaron mayor contenido de azúcares que los alcalinos (Tabla 4), lo que sugiere que puede haber ocurrido algún tipo de modificación durante el proceso de lisis alcalino.

Se ha postulado, que el proceso mecánico, al preservar la estructura de los antígenos bacterianos, logra un lisado más inmunogénico, y con mayor capacidad inmunoestimulante [53], [76], [89]. Se ha sugerido entonces, que las modificaciones de los componentes que tienen lugar en los lisados alcalinos afectarían su inmunogenicidad [55], aunque el lisado comercial más utilizado, OM-85 BV, es obtenido por lisis alcalina y se ha probado ampliamente que es inmunogénico [66], [79]. Aunque, cabe aclarar, que este no ha sido comparado con un producto que posea los mismos componentes, pero que fuera

obtenido por lisis mecánica, como se realiza en este trabajo, lo cual brindaría conocimientos contundentes en cuanto a su proceso y capacidad inmunogénica.

El MALDI-TOF permite la identificación de proteínas únicas presentes en cada microorganismo, lo que lo hace una herramienta útil para la identificación de diferentes microorganismos a nivel clínico y de investigación, y para el control de calidad ambiental o de alimentos, entre otros [90], [91]. La utilización del MALDI-TOF en este trabajo aportó información sobre la calidad del proceso de obtención de los lisados, además de la caracterización de los mismos. Se observaron espectros característicos para cada cepa bacteriana, con marcadores identificables, adecuados para poder evaluar la reproducibilidad del proceso de lisis. Como se observa en la Figura 8, en el espectro del lisado mecánico de *H. influenzae* se pueden identificar más proteínas que en el alcalino. Además en ambos espectros se conservan algunas proteínas características de la cepa bacteriana, pero la intensidad de éstas en el mecánico es mayor, y posee menos ruido. Esto se observó para todas las cepas bacterianas de trabajo, indicando como el proceso químico que lleva a la producción de los lisados alcalinos, afecta la estructura proteica y esto se ve reflejado también en los espectros de MALDI-TOF.

Además de ser una herramienta rápida y robusta para la caracterización, se incorporó el MALDI-TOF en este trabajo, buscando identificar posibles bio-marcadores en la producción de distintos lotes de los lisados bacterianos, de forma similar a como se utiliza en la industria en el control de calidad de fármacos biotecnológicos. Estos resultados fueron recientemente aceptados para su publicación [84].

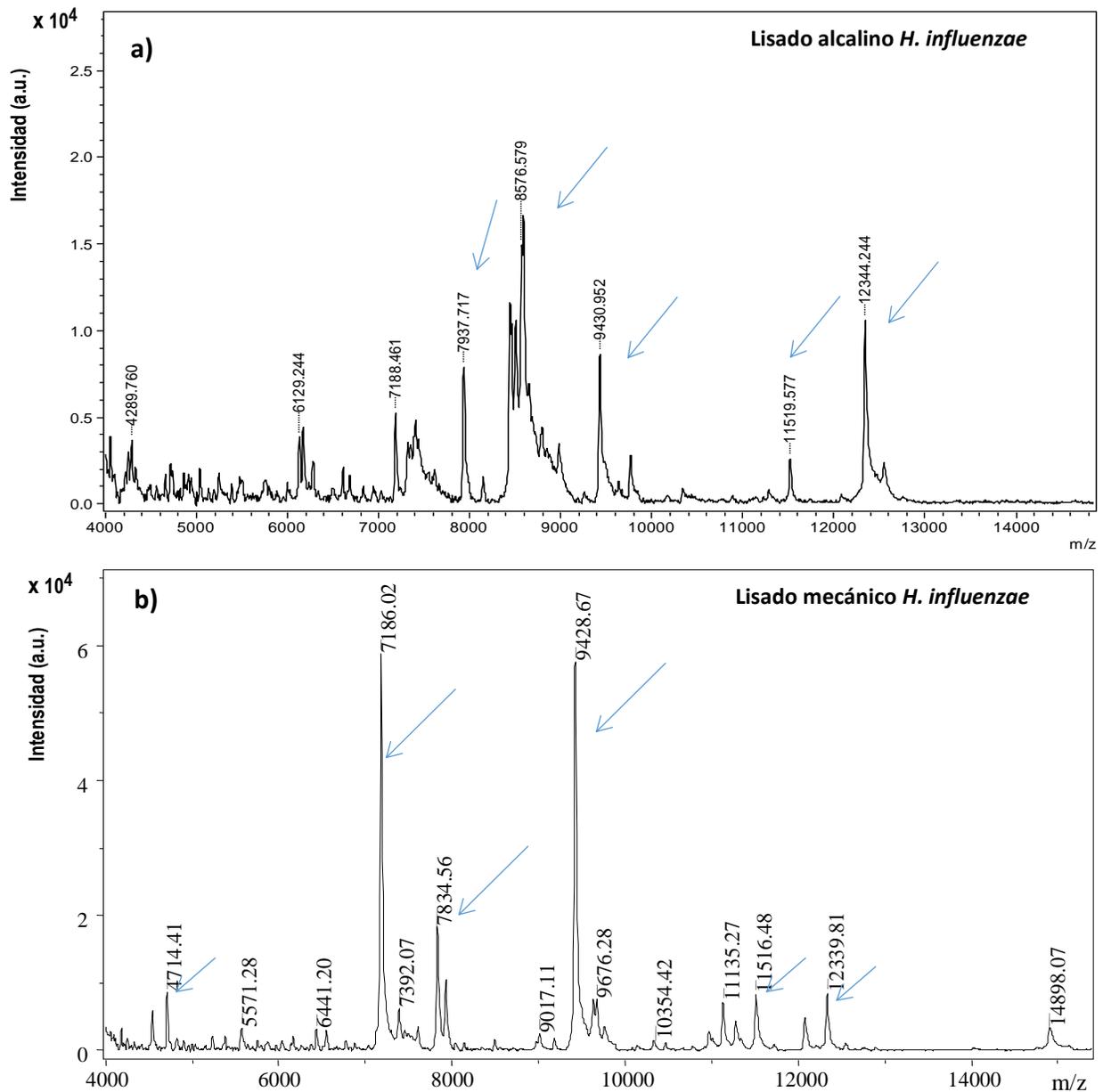


Figura 8. Espectro de masa MALDI-TOF para los lisados de *Haemophilus influenzae*. Representación de intensidad vs. relación masa/carga (m/z). **a)** Lisado alcalino de *H. influenzae*. **b)** Lisado mecánico de *H. influenzae*. Las flechas indican proteínas seleccionadas como posibles marcadores en base a su intensidad y reproducibilidad.

2. Evaluación de la actividad biológica de los lisados bacterianos mediante ensayos *in vitro*

IV.2.1. Estimulación de la línea celular alveolar humana A549

La línea A549 posee características de células alveolares tipo II de pulmón y representa un modelo *in vitro* útil para el estudio del epitelio pulmonar [92]. Se evaluó la capacidad de los lisados bacterianos polivalentes de estimular esta línea epitelial. En primer lugar, se comprobó que los lisados no resultaran tóxicos para las células, a ninguna de las concentraciones evaluadas, mediante ensayos de MTT. Luego se realizaron los ensayos de estimulación, realizando una cinética de estimulación y evaluando el perfil transcripcional por qPCR (Figura 9).

Los lisados bacterianos polivalentes mostraron una elevada actividad pro-inflamatoria, caracterizada por una rápida respuesta, observándose el pico de actividad entre 1 y 3 horas. Esta actividad se caracterizó por la elevada producción de quimioquinas como *Ccl20*, *Cxcl1* y *Cxcl8*, que son mediadoras de la inflamación y quimioatrayentes de neutrófilos y linfocitos. Además *Cxcl8* también regula la producción de proteínas de adhesión y estimula la angiogénesis. En este contexto inflamatorio también se observaron incrementos en los niveles relativos de ARNm de citoquinas como *Tnfa*, que promueve la inflamación y produce otros mediadores como *Il6*, que también se vio aumentada. Esto también había sido observado por nuestro grupo de trabajo con otro extracto bacteriano inmunomodulador [71].

En el pico de actividad pro-inflamatoria (1-3 hs), las células estimuladas con el lisado mecánico presentaron incrementos en la expresión de mensajeros significativamente mayores en comparación con el lisado alcalino. Este incremento fue por lo menos del doble y en algunos casos, hasta 10 veces más (*Tnfa*), observándose en las citoquinas (excepto *Il6* a 3 horas, que mostró igual actividad que el alcalino) y en todas las quimioquinas analizadas.

Varios autores han sugerido la importancia de la secreción de péptidos antimicrobianos por parte de las células epiteliales, principalmente, como mecanismo de defensa del pulmón. Estos péptidos antimicrobianos son importantes mediadores de la inflamación y

quimioatrayentes de células efectoras [93], [94]. Aquí se estudió la producción de péptidos antimicrobianos presentes en el epitelio pulmonar y que habían sido reportados sobre-regulados frente a la estimulación con un lisado bacteriano [67].

A diferencia de las citoquinas y quimioquinas, la expresión de los péptidos antimicrobianos se observó a tiempos más largos, obteniendo un aumento significativo en los niveles relativos de ARNm respecto a las células sin estimular para *Lcn2* (a 12, 24 y 48 hs) y para *S100a9* (a 24 y 48 hs). Si bien se observaron diferencias significativas a determinados puntos entre las células estimuladas con el lisado mecánico y el alcalino, aquí no se puede determinar una tendencia clara que indique que un lisado presente mayor producción de péptidos antimicrobianos en comparación con el otro.

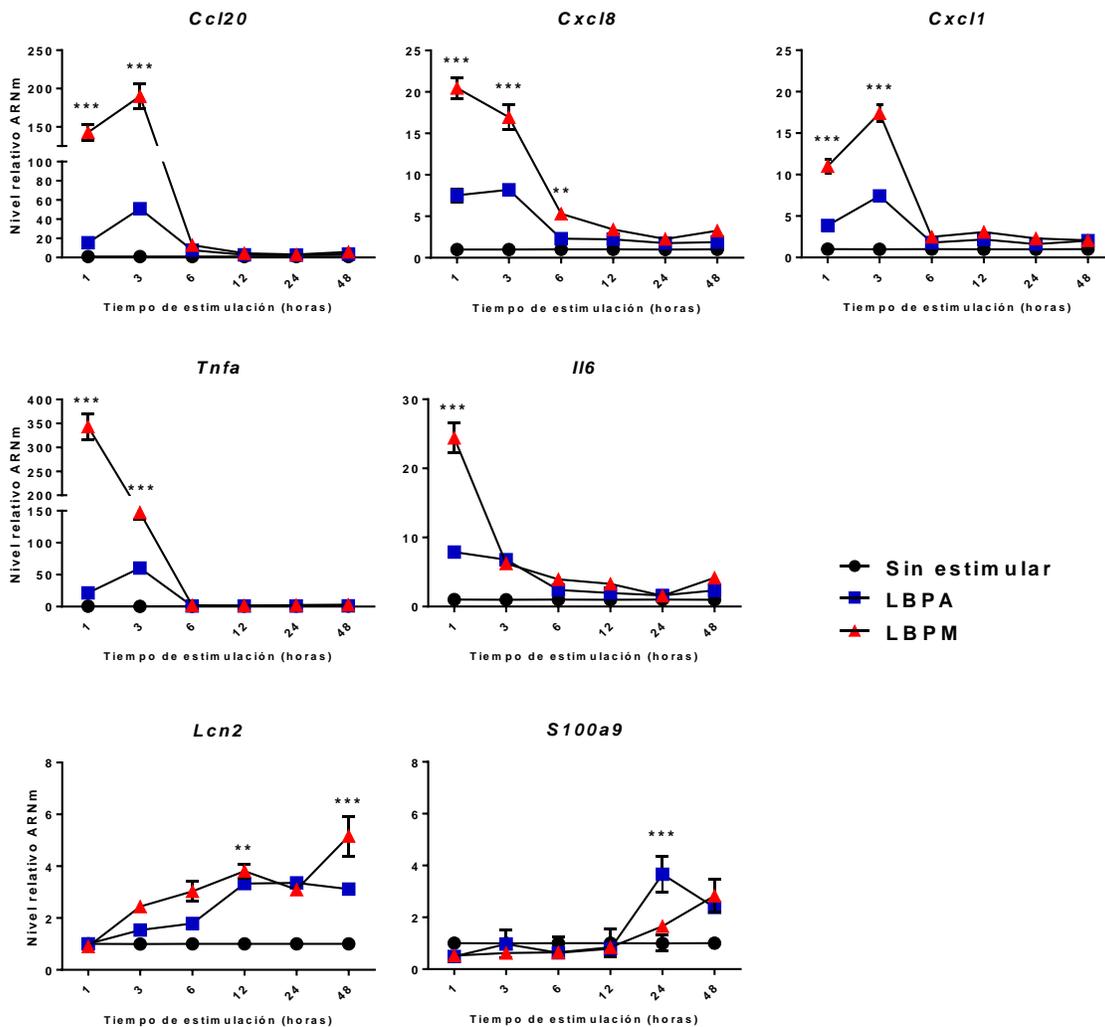


Figura 9. Evaluación temporal del perfil transcripcional de la línea A549 estimulada con los lisados bacterianos polivalentes alcalino o mecánico. Las células se estimularon con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada lisado. Se realizó una cinética de estimulación a seis tiempos: 1, 3, 6, 12, 24 y 48 horas. Se evaluó el perfil transcripcional por qPCR con primers específicos para los genes indicados. La cuantificación relativa se realizó por el método de ΔCt empleando como gen housekeeping β -2-microglobulina humana. Los resultados se muestran como incremento respecto al control sin estimular (media \pm SEM de cada condición por quintuplicado). Las diferencias entre los grupos LBPA vs. LBPM se determinaron mediante el test de ANOVA de dos vías y se indican con (**) para $p < 0.01$ y (***) para $p < 0.001$.

IV.2.2. Líneas reporteras para la evaluación de la activación de NF- κ B y/o AP-1 mediada por lisados bacterianos

IV.2.2.1. Línea de macrófagos murinos RAW-Blue

La utilización de esta línea reportera mostró que la estimulación de los macrófagos murinos con los lisados bacterianos de todas las cepas de trabajo, produce la activación de NF- κ B y/o AP-1 (Figura 10). Esto se evaluó midiendo la producción de la proteína reportera SEAP a las 24 hs, y se observó que los lisados bacterianos polivalentes fueron los que presentaron los mayores incrementos relativos respecto al sin estimular. En el caso de los lisados monovalentes, fueron los lisados de las bacterias gram - (*H. influenzae* y *K. pneumoniae*) los que mostraron los mayores niveles de producción de proteína reportera, comparables con los de los polivalentes. Mientras que los lisados de las bacterias gram + (*S. aureus* y *S. pneumoniae*) a la misma concentración que los demás lisados mostraron muy baja activación. Al aumentar la concentración al doble, se observó un efecto dosis-respuesta, aumentando la producción de SEAP y presentando una mayor activación por parte de los lisados mecánicos al compararse con su igual en versión alcalina (Figura 11). Esta diferencia no se observó en el caso de los otros lisados monovalentes ni polivalentes, lo que puede indicar que efectivamente no ocurre en estos lisados o que al ser fuertes activadores de NF- κ B y/o AP-1, se produce una saturación de señal de manera rápida. Podría ocurrir una diferencia en la activación debido a los procesos de obtención de los lisados, siendo los mecánicos los que preservan mejor los antígenos como se mencionó (IV.1.2), y son mejor reconocidos por los PRRs. Posiblemente trabajando a una concentración menor, se hubiera podido observar si efectivamente existían diferencias de activación entre los lisados producidos por ambos tipos de lisis.

Para evaluar en qué medida la fracción proteica de los lisados contribuía a la activación de NF- κ B y/o AP-1, los lisados bacterianos se sometieron a digestión con tripsina, enzima que hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas, obteniendo de esta manera péptidos de menor tamaño y AA libres. Estos lisados tripsinizados, sin proteínas integras, fueron testeados en las células RAW-Blue (Figura 12). Se observó que no presentaron diferencias de activación con los lisados sin digerir, lo que está indicando que no son las proteínas los

ligandos que son reconocidos por los receptores celulares y que inician la activación de NF- κ B y/o AP-1.

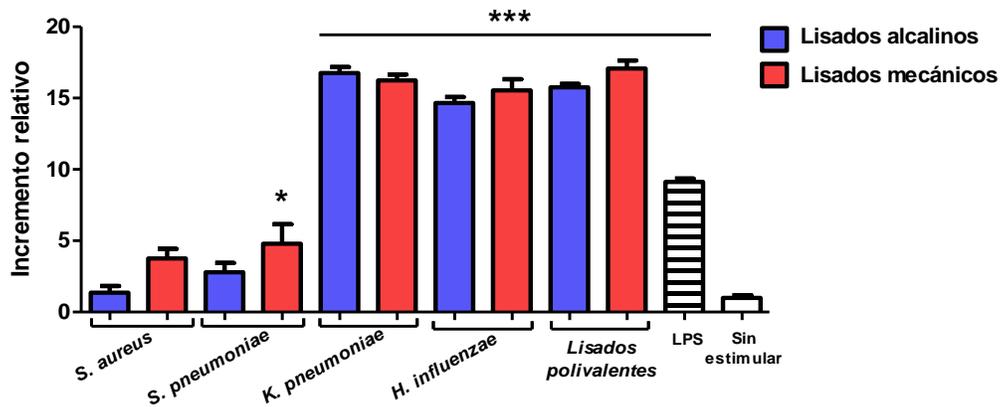


Figura 10. Perfil de estimulación de las células RAW-Blue (por quintuplicado) con los lisados bacterianos polivalentes, o los monovalentes de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* o *H. influenzae*, obtenidos por lisis alcalina o mecánica a 10 μ g/ml. Como control positivo se utilizó 1 μ g/ml de LPS (agonista de TLR4). A las 24 hs se evaluó la producción del reportero SEAP, agregando QUANTI-Blue (O.D. a 638 nm). Se representa como el incremento relativo respecto al sin estimular (Media \pm SEM). Las diferencias entre los grupos tratados respecto al sin estimular se determinaron mediante el test de ANOVA de una vía y se indican con (*) para $p < 0.05$ y (***) $p < 0.0001$.

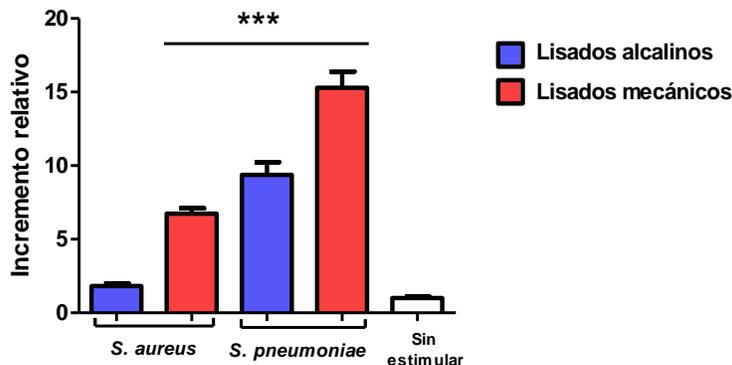


Figura 11. Células RAW-Blue estimuladas (por quintuplicado) con los lisados bacterianos monovalentes de *S. aureus* o *S. pneumoniae*, obtenidos por lisis alcalina o mecánica a una concentración de 20 μ g/ml. A las 24 hs se evaluó producción de la proteína reportera SEAP, por agregado de QUANTI-Blue y lectura de O.D. a 638 nm. Se representa como el incremento relativo respecto al sin estimular (Media \pm SEM). Las diferencias entre los grupos tratados respecto al sin estimular se determinaron por el test de ANOVA de una vía y se indican con (***) para $p < 0.0001$.

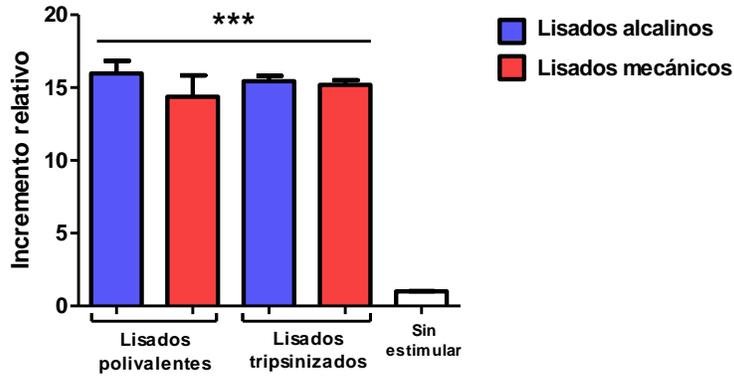


Figura 12. Células RAW-Blue estimuladas (por triplicado) con los lisados bacterianos polivalentes, obtenidos por el método de lisis alcalina o mecánica a una concentración de 10 µg/ml, o la misma cantidad de lisado bacteriano tratado con tripsina-EDTA e incubado para su hidrólisis. A las 24 hs se evaluó la producción de SEAP, agregando QUANTI-Blue y midiendo O.D. a 638 nm. Se representa como el incremento relativo respecto al sin estimular (Media ± SEM). Las diferencias entre los grupos tratados respecto al sin estimular se determinaron mediante el test de ANOVA de una vía y se indican con (***) para $p < 0.0001$.

IV.2.2.2. Línea celular HEK-Blue mTLR4

La estimulación de la línea reportera HEK-Blue mTLR4 con los lisados bacterianos polivalentes indujo la activación NF-κB y/o AP-1 (Figura 13). Se observó que los lisados bacterianos polivalentes interaccionan fuertemente con TLR4, obteniendo valores similares a los obtenidos al estimular esta línea con el agonista de este TLR, el lipopolisacárido (LPS). Concentraciones crecientes de LPS mostraron un efecto dosis-respuesta esperado, y la mayor dosis utilizada (10 ng/ml) mostró una producción del reportero SEAP comparable a la producida por ambos lisados polivalentes.

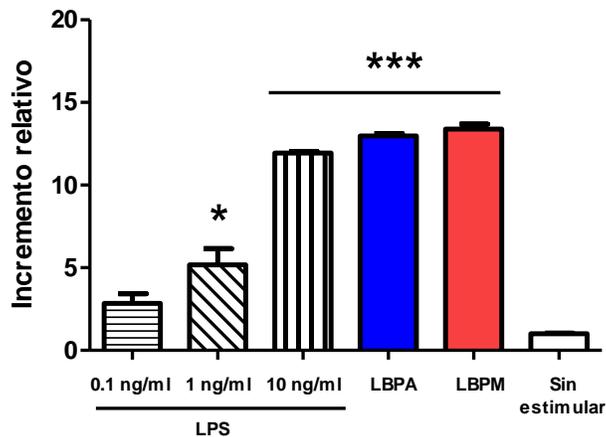


Figura 13. Células HEK-Blue mTLR4 estimuladas (por triplicado) con los lisados bacterianos polivalentes, obtenidos por el método de lisis alcalina o mecánica a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y con dosis crecientes de LPS: 0.1, 1 y 10 ng/ml . A las 24 hs se evaluó la producción de SEAP mediante el método de QUANTI-Blue (O.D. a 638 nm). Se representa como el incremento relativo respecto al sin estimular (Media \pm SEM). Las diferencias respecto al sin estimular se determinaron mediante el test de ANOVA de una vía y se indican con (*) para $p < 0.05$ y (***) para $p < 0.0001$.

IV.2.2.3. Línea de monocitos humanos THP1-XBlue

La estimulación de la línea de monocitos humanos THP1-XBlue, con todos los lisados bacterianos de las cepas de trabajo indujo la activación de NF- κ B y/o AP-1 (Figura 14). De la misma forma que se observó para la línea de macrófagos murinos (Figura 10), los lisados polivalentes y los lisados monovalentes de las cepas gram - mostraron una señalización fuerte y comparable entre sí. Por otro lado, los lisados monovalentes gram + fueron los que produjeron una menor producción del reportero, y necesitaron concentraciones más altas para mostrar una activación comparable a los demás lisados. Aquí también se observó que fueron los lisados alcalinos los que generaron la señal más débil, frente a sus versiones mecánicas, algo que no se observa de forma clara para los lisados polivalentes y los lisados monovalentes gram -, seguramente por lo explicado anteriormente para las células RAW-Blue (IV.2.2.1).

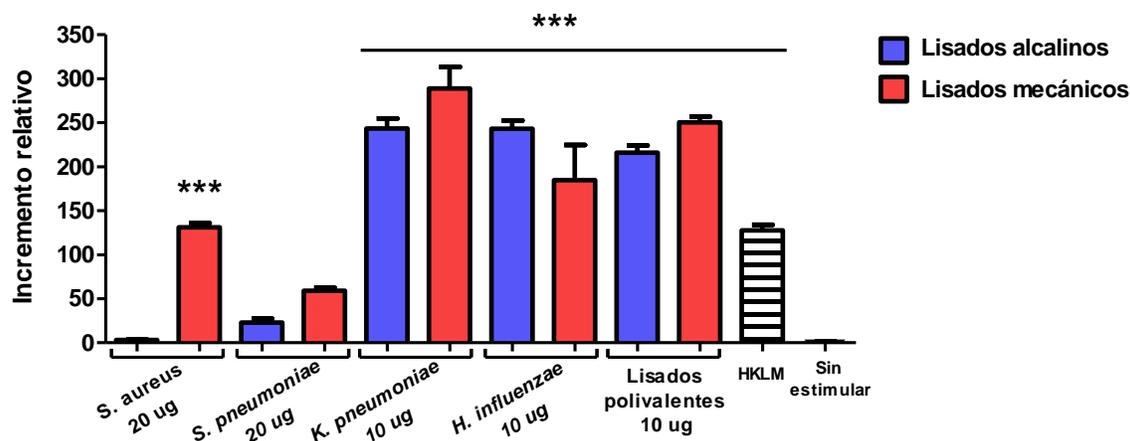


Figura 14. Perfil de estimulación de las células THP1-XBlue (por quintuplicado) con los lisados bacterianos polivalentes, o con los lisados monovalentes de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* o *H. influenzae* obtenidos por lisis alcalina o mecánica. Se utilizaron 10^8 células/ml de *Lysteria monocytogenes* inactivadas por calor (HKLM) como control positivo de la línea parental (agonista de TLR2). A las 24 hs se evaluó la producción del reportero SEAP adicionando QUANTI-Blue y midiendo O.D. a 638 nm. Se representa como el incremento relativo respecto al sin estimular (Media \pm SEM). Las diferencias entre los grupos tratados respecto al sin estimular se determinaron mediante el test de ANOVA de una vía y se indican con (***) para $p < 0.0001$.

Las líneas RAW-Blue y THP1-XBlue expresan varios tipos de receptores, pero aquí se descarta la intervención de los presentes en la línea RAW-Blue que reconocen motivos virales (RIG-1) y fúngicos (Dectina-1). Sí podrían participar en el reconocimiento de los componentes de los lisados bacterianos los receptores NOD-1 y 2, y todos los receptores tipo Toll. Con el ensayo de tripsinización (Figura 12) se observó que no son los ligandos proteicos los que son reconocidos por los receptores, lo cual descarta la participación de TLR5 el único con un agonista proteico como la flagelina. Considerando que ninguna de las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo posee flagelo, sería razonable que TLR5 no participe.

Asumimos que la estimulación con los lisados bacterianos de los macrófagos o monocitos, está dada por la interacción con los receptores de superficie celular, principalmente por los TLRs de superficie que reconocen motivos bacterianos como lipopéptidos, glicopéptidos y lipopolisacáridos (TLR1/2, TLR2/6 y TLR4, respectivamente). Si bien las moléculas medianas y pequeñas de los lisados, podrían llegar a ingresar al interior celular por

endocitosis mediada por receptores, y podrían ser reconocidas por los receptores intracelulares del citosol o el endosoma, esto es difícil de comprobar en este modelo. En la línea THP1-XBlue los receptores intracelulares son prácticamente indetectables y en la RAW-Blue, que sí responden a ellos, solo el TLR9 que reconoce CpG podría estar participando.

Al observar que los lisados monovalentes de las cepas gram - demostraron ser los principales activadores de NF- κ B y/o AP-1 vía receptores celulares de los macrófagos y monocitos, se puede asumir que es debido al LPS, agonista de TLR4 y que constituye la membrana externa de las gram -. El ensayo de estimulación en la línea HEK-Blue mTLR4 (Figura 13) mostró que efectivamente los lisados bacterianos interaccionan con TLR4 en gran medida, de forma comparable a como lo hace el LPS purificado. Por otro lado, al observar la Figura 10 vemos que al estimular las células RAW-Blue con LPS purificado a una concentración de 1 μ g/ml (100 veces mayor que la utilizada en la línea HEK-Blue mTLR4), éste activa NF- κ B y/o AP-1, pero en menor medida que los lisados bacterianos. Por lo tanto podemos inferir que el LPS por sí solo no es el único responsable de la actividad estimulante de los lisados gram - y de los polivalentes y que hay otros agonistas de TLRs, que están interaccionando con ellos y participando en la activación de NF- κ B y/o AP-1.

Recientemente se ha descubierto un metabolito de las bacterias gram -, que participa en la biosíntesis de LPS, HBP (heptose -1,7-biphosphate) que puede activar por sí solo NF- κ B. Las especies de *Neisseria* liberan HBP al exterior, pero las demás bacterias gram -, en una infección natural, solo la liberarían cuando la bacteria ingresa al lisosoma y se lisa [95]. Se ha visto que los lisados de varias cepas gram - activan NF- κ B en líneas celulares que no responden a otros PRRs [96]. Por lo tanto, en nuestro caso al tratarse de lisados bacterianos, HBP podría ser reconocido y activar NF- κ B por otra vía que aún no podemos identificar, pero tampoco descartar.

En la Figura 14 podemos observar como HKLM (*L. monocytogenes* inactivada por calor), control de la línea parental y agonista de TLR2, activa NF- κ B y/o AP-1 pero no en igual

magnitud que los lisados polivalentes, de manera similar a lo observado para LPS. Por todo esto, consideramos que la activación de NF- κ B y/o AP-1 por parte de los lisados bacterianos, no es debido a un solo agonista ni a un solo receptor, sino que debe ocurrir un reconocimiento de múltiples agonistas por varios receptores que actuarían de manera sinérgica, causando una potenciación de la señal.

IV.2.2.4. Línea de monocitos humanos THP1-XBlue-DefMyD

Esta línea celular es deficiente en el adaptador celular MyD88, por lo que es incapaz de responder a la activación de receptores que dependan de MyD88. Sin embargo, sí se mantiene la respuesta de receptores independientes de MyD88.

Al estimular esta línea celular con los lisados bacterianos polivalentes no se detectó producción de la proteína reportera, indicando que la activación de NF- κ B y/o AP-1 por parte de los lisados bacterianos es dependiente del adaptador celular MyD88 (Figura 15). Esto confirma la hipótesis que los TLRs son los principales receptores que interactúan con los lisados bacterianos, ya que todos los TLRs, excepto TLR3, reclutan MyD88 e inician la cascada de señalización para activar NF- κ B y/o AP-1.

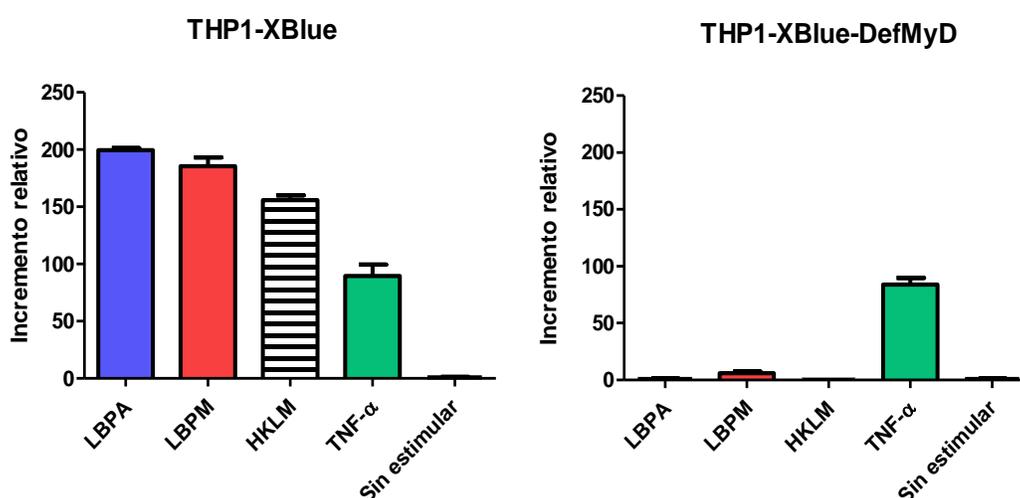


Figura 15. Perfil de respuesta dependiente e independiente de MyD88 en las células THP1-XBlue y THP1-XBlue-DefMyD. Estas fueron estimuladas (por triplicado) con 10 μ g/ml de los lisados bacterianos polivalentes, alcalino y mecánico, 10⁸ células/ml de *Lysteria monocytogenes* inactivadas por calor (HKLM) como control positivo de la línea parental (agonista de TLR2), y 50

ng/ml de TNF- α , como control de activación independiente de MyD88 (utiliza su propio adaptador celular TNFR). Luego de 24hs de estimulación se midió el reportero SEAP mediante el método de QUANTI-Blue (O.D. a 638 nm). Se representa como el incremento relativo respecto al sin estimular (Media \pm SEM).

TLR4 es el único receptor que puede iniciar la cascada de señalización ya sea vía MyD88 o vía TRIF, y que puede utilizar varias proteínas adaptadoras [10]. Los resultados indican que si los lisados bacterianos interactúan con TLR4, como se sugiere, este solo utiliza la vía MyD88-dependiente para activar NF- κ B y/o AP-1. Como se observa en el ensayo en la línea THP1-XBlue-defMyD, TLR4 al no contar con MyD88, no inicia la señalización ni recluta otras proteínas adaptadoras para la activación vía MyD88-independiente.

Esta dependencia por parte de los lisados bacterianos del adaptador celular MyD88 había sido reportada en un modelo *in vivo*, al utilizar ratones deficientes para MyD88 y para TRIF, estimulados con un lisado bacteriano y desafiados con un agente patógeno. Aquí se pudo establecer la dependencia del adaptador MyD88, pero no de TRIF, en la acción del lisado bacteriano como inmunoestimulante [74].

Utilizando la línea THP1-XBlue-defMyD, se podría observar el reconocimiento de los lisados bacterianos por medio de los receptores tipo NOD, que no utilizan MyD88. Los receptores NOD-1 y 2, al reconocer los peptidoglicanos de las bacterias comienzan una oligomerización del dominio central que recluta la proteína adaptadora citosólica RIP2, mediante interacciones CARD (*caspase recruitment domain*) que llevan a la activación de NF- κ B y/o AP-1 [12]. Sin embargo, este reconocimiento parece no ocurrir, lo que podría deberse a que los lisados bacterianos no estén ingresando citosol de las células, por lo menos en estas condiciones.

IV.3. Evaluación *in vivo* de la actividad biológica de los lisados bacterianos polivalentes

IV.3.1. Puesta a punto del modelo murino como herramienta de trabajo en la evaluación de los lisados bacterianos

IV.3.1.1. Puesta a punto de la administración intranasal de los lisados bacterianos

El primer paso fue elegir la vía de administración en el modelo murino. Se eligió la ruta intranasal (i.n) por su fácil administración. Se consideró que el volumen a administrar para que el inóculo llegara al pulmón y no quedara solo en las fosas nasales, debía ser como mínimo de 30 μ l. Además, esta vía de administración ya había sido usada previamente en nuestro laboratorio para los estudios con otros lisados bacterianos [70].

Se probó en primer lugar, la administración de una dosis de 6 μ g/30 μ l y se evaluó 24 hs post-administración la respuesta pro-inflamatoria generada en BAL y pulmón. Luego se aumentó la dosis para los ensayos de protección como se indica más adelante.

IV.3.1.2. Caracterización de la actividad biológica de los lisados bacterianos en el pulmón

Luego de poner a punto la administración de los lisados, se buscó ver el efecto generado por los lisados bacterianos en el pulmón, buscando caracterizar las poblaciones celulares y la producción de intermediarios pro-inflamatorios.

Los lisados polivalentes fueron administrados por vía i.n. a una concentración de 6 μ g en 30 μ l de inóculo. Se extrajeron los pulmones de animales sacrificados a las 4 y 24 hs post-administración y se realizó BAL a las 24 hs. Las células obtenidas de los BAL fueron marcadas con anticuerpos monoclonales y analizadas por citometría de flujo.

La muestra de BAL es muy representativa para observar reclutamiento de neutrófilos, ya que en un ratón naïve alrededor del 90% de las células presentes en los bronco-alvéolos son macrófagos alveolares [8]. Por tanto, frente a un estímulo, la entrada de neutrófilos se evidencia fácilmente. Se definieron los macrófagos como CD11c⁺F4/80⁺ y los neutrófilos como células CD11b⁺Ly6G⁺. Se observó un aumento significativo en la cantidad de

neutrófilos presentes en BAL en los grupos tratados con los lisados bacterianos, alcalino y mecánico, respecto al grupo control (Figura 16, panel izquierdo). La administración de los lisados indujo el reclutamiento de neutrófilos, observando que la cantidad de neutrófilos presentes en los grupos que recibieron los lisados bacterianos fue 20 veces mayor que la presente en el grupo que recibió solución salina. También se observó un aumento significativo en el número de macrófagos en el grupo que recibió el lisado mecánico con respecto al grupo que recibió solución salina. Estos resultados evidencian una rápida respuesta y reclutamiento de intermediarios celulares de la inflamación, frente a la administración de los lisados bacterianos. El aumento de las poblaciones de macrófagos y neutrófilos presentes en BAL había sido observado administrando un lisado bacteriano, pero a una concentración muy superior que la aquí administrada [81]. Cabe destacar el rápido efecto que causan LBPA y LPBM con una sola dosis y en una baja concentración.

En las muestras de BAL también se observó un aumento significativo en la población de células *natural killer* (NK), definidas con el marcador NK1.1, en los grupos tratados con LBPM o LBPA en relación al grupo control (Figura 16, panel derecho). El reconocimiento de los ligandos bacterianos por parte de los PPRs presentes en las células NK inducen su acción citotóxica, que además se puede ver potenciada por la producción de citoquinas por otros tipos celulares [97].

En BAL también se analizó la presencia de células T (linfocitos CD3⁺) y NKT (NK1.1⁺CD3⁺). La población de linfocitos CD3⁺ mostró estar aumentada en los grupos tratados, en el caso del LBPA de forma significativa (Figura 16, panel derecho), pero no se detectaron células NKT en ninguno de los grupos.

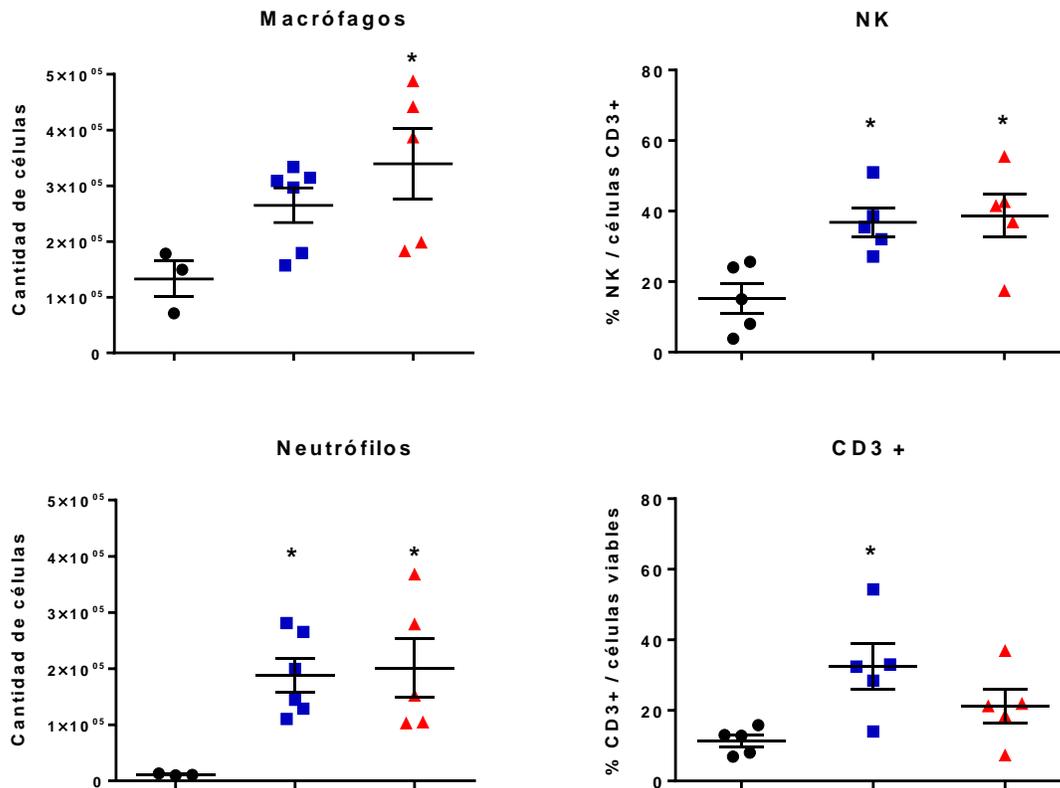


Figura 16. Análisis por citometría de flujo de las diferentes poblaciones celulares encontradas en BAL 24 hs después de la inmunización vía i.n. con 6 µg/30 µl de LBPA, LBPM o solución salina. Se definieron las poblaciones de macrófagos como CD11c⁺F4/80⁺ y de neutrófilos como CD11b⁺Ly6G⁺, expresadas en cantidad de células (panel izquierdo). También se identificaron las células NK (NK1.1⁺) y las células T CD3⁺, representadas en % en el total de células viables (panel derecho). Las diferencias entre los grupos se determinaron mediante el test de ANOVA de una vía y se indican con un asterisco (*) para p<0.05.

Los pulmones extraídos a las 4 y 24 hs post-administración con los lisados bacterianos se analizaron por RT-qPCR (Figura 17). Por un lado, los grupos tratados con LBPA o LBPM mostraron un aumento significativo a las 4 hs que decayó a las 24 hs, en los niveles relativos de ARNm de *Cxcl1*, *Ccl20*, *Il6*, *Il1b* y *S100a9* (excepto LPBM), comparado con el grupo que recibió solución salina. Por otro lado los niveles relativos de *Il10*, *Tnfa*, *Ifng*, *Il17a* y *Lcn2* se encuentran aumentados en forma significativa tanto a las 4, como a las 24 hs, para los grupos que recibieron LBPA o LPBM.

La evaluación a las 4 y 24 hs post-administración de los lisados, evidencia una respuesta pro-inflamatoria rápida, de forma similar a lo observado en la línea alevolar (Figura 9) donde se produce un pico de actividad muy temprano. Es de notar que las quimioquinas involucradas en el reclutamiento celular de neutrófilos y linfocitos (*Cxcl1* y *Ccl20*) muestran su pico de actividad a las 4 hs post-administración de los lisados. Allí también aparecen las citoquinas que son secretadas mayoritariamente por macrófagos que fueron activados, como *Il6* e *Il1b*, importantes mediadores de la inflamación y proliferación celular. Tanto a las 4 como a las 24 hs se observa la producción de *Tnfa* e *Il17a*, claves también en la estimulación de otras citoquinas y mediadores inflamatorios como el óxido nítrico. Es importante destacar también la producción de citoquinas *Il10* e *Ifng*, importantes en la activación de macrófagos y mediadores de la generación de una respuesta Th1.

En general, los grupos tratados con LBPA o LBPM se comportaron de forma similar, mostrando en algunos casos diferencias significativas entre ellos, pero de forma alternada. Es por esto que no se puede apreciar una tendencia clara en relación a quien produjo mayores niveles de genes pro-inflamatorios.

La generación de una respuesta inflamatoria mediada por citoquinas y quimioquinas en pulmón, había sido observada previamente por nuestro grupo, administrando 3 dosis de un extracto bacteriano coloidal. Es para destacar entonces, la potente respuesta obtenida que se obtuvo con una sola dosis de LPBA o LPBM y a una baja concentración, lo que posiciona a los lisados bacterianos producidos en este trabajo como poderosos inmunoestimulantes.

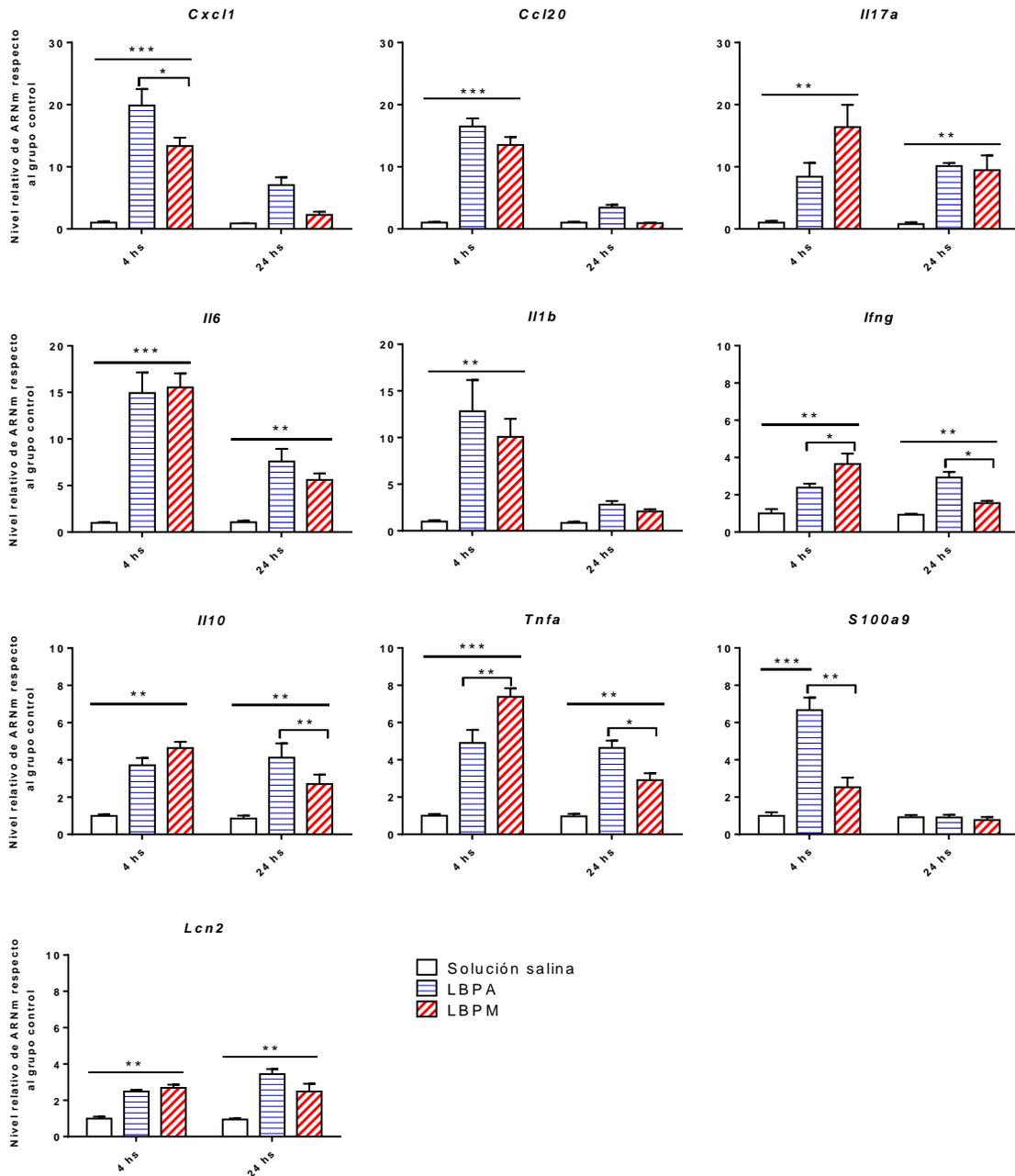


Figura 17. Perfil transcripcional por RT-qPCR en pulmones de ratones C57BL/6 sacrificados 4 o 24 hs después de recibir vía i.n. 6 μ g/30 μ l de LBPA o LBPM. El grupo control recibió solución salina. La cuantificación relativa se realizó por el método de Δ Ct empleando el gen murino de la β -actina como housekeeping. Los resultados se muestran como incremento respecto al grupo control. Las barras representan la media \pm SEM (n=5) de cada condición. Las diferencias significativas entre los grupos indicados se determinaron mediante el test de ANOVA de una vía, y se indican con (*) p<0.05, (**) p<0.005 y (***) p<0.0001.

IV.3.2. Modelo de neumonía neumocócica

IV.3.2.1. Determinación de la Mínima Dosis Letal de *S. pneumoniae* serotipo 1

El modelo de neumonía neumocócica causado por *S. pneumoniae* serotipo 1 (Sp1) se encuentra bien caracterizado en el laboratorio. Se ha estudiado la susceptibilidad de las cepas de ratones C57BL/6 frente al desafío intranasal con dosis crecientes de Sp1 y se ha caracterizado la evolución de la carga bacteriana en pulmones y sangre, así como el perfil transcripcional y el reclutamiento celular [87].

En este trabajo se buscó definir la mínima dosis letal (MDL) de Sp1, capaz de causar un 100% de mortalidad en ratones C57BL/6. Para ello se preparó el inóculo de Sp1 en solución salina, se hicieron diluciones seriadas y los ratones fueron inoculados por vía i.n. con estas dosis. Se determinó que la MDL fue de 3×10^6 UFC/50 μ l (Figura 18).

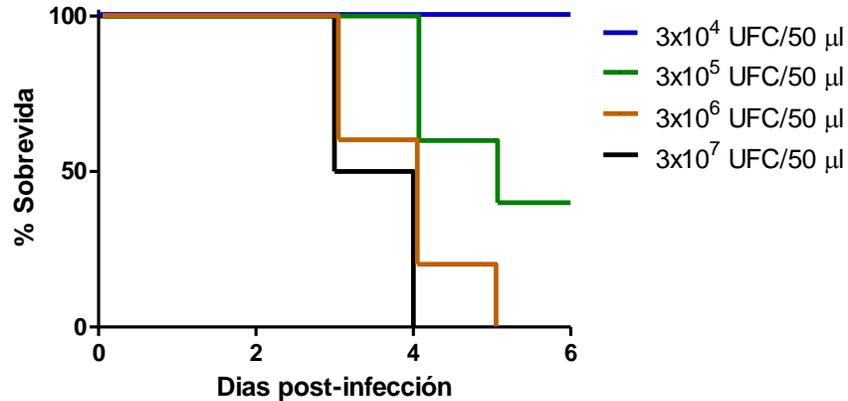


Figura 18. Susceptibilidad a la infección intranasal con *S. pneumoniae* serotipo 1 (Sp1). Hembras C57BL/6 (n=6) fueron infectadas vía i.n. con diferentes dosis de Sp1 (3×10^4 , 3×10^5 , 3×10^6 o 3×10^7 UFC en 50 μ l). La supervivencia fue monitoreada diariamente.

IV.3.3. Evaluación de los lisados polivalentes como tratamiento frente al desafío con *S. pneumoniae*

Luego de poner a punto la administración de los lisados polivalentes, y habiendo comprobado su rápida acción estimuladora de las defensas innatas (IV.3.2), se procedió a estudiar si esta era suficiente para contener una infección letal. Los ratones se inocularon con los lisados LBPA o LBPM, inicialmente a una concentración de 6 µg/30 µl finales, o con solución salina. A las 24 hs los ratones se desafiaron con la MDL de Sp1 por ruta i.n. Ambos lisados administrados en baja concentración, fueron capaces de inducir una protección del 50-65%, en diversos experimentos de supervida (Figura 19). Los animales fueron controlados diariamente, mostrando indicios de enfermedad como el pelo erizado y quietud durante las primeras 24 hs post-infección, desapareciendo los síntomas en los días siguientes en los animales que sobrevivieron.

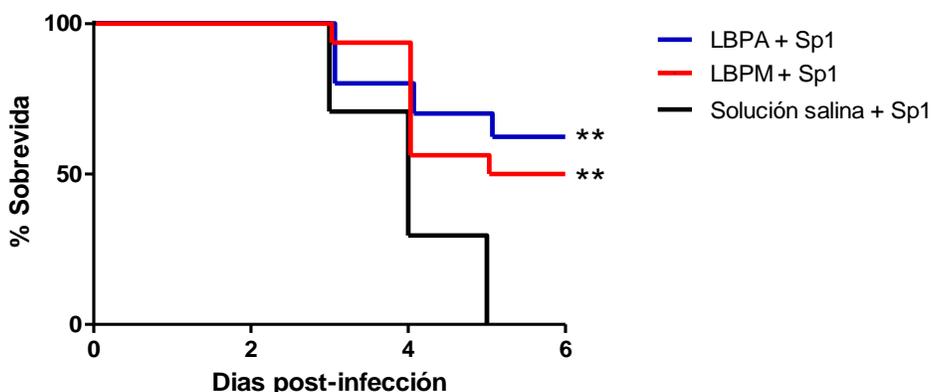


Figura 19. Protección frente a *S. pneumoniae* serotipo 1 inducida por el tratamiento i.n. con los lisados bacterianos polivalentes. Hembras C57BL/6 (n=8) inoculadas vía i.n. con LBPA o LBPM (6 µg/30 µl) o solución salina (grupo control) y a las 24 hs desafiadas vía i.n. con la MDL de Sp1 (3×10^6 UFC/50 µl). Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los grupos tratados comparadas respecto al grupo control se evaluaron mediante el test de Log-rank (Mantel-Cox), los asteriscos (**) indican diferencias significativas ($p < 0.01$). Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Con el fin de investigar si la protección mediada por los lisados dependía de la concentración utilizada, se utilizó el LBPM a una concentración 3 veces mayor (3X), es decir 18 μg administrados en el mismo volumen (30 μl). Al utilizar el LBPM a 3X, la protección frente al desafío letal con Sp1 aumento a más de un 80% (Figura 20), mostrando un efecto dosis-dependiente. Esta protección mostró una alta reproducibilidad en varios experimentos de sobrevida independientes entre sí.

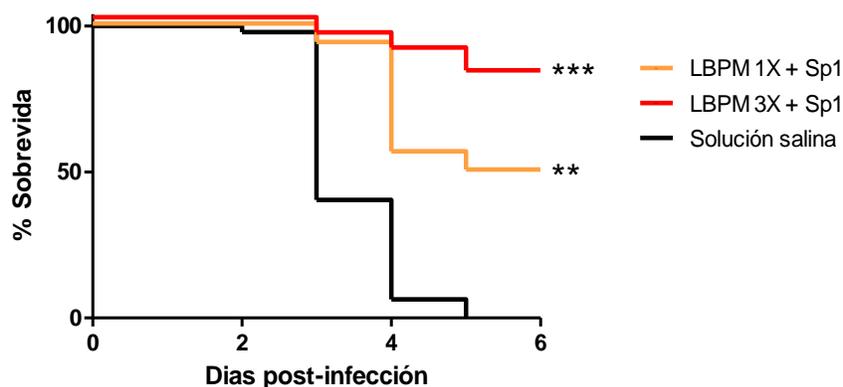


Figura 18. Efecto dosis dependiente en la protección frente a *S. pneumoniae* serotipo 1. Hembras C57BL/6 inoculadas vía i.n. con 6 μg (1X) o 18 μg (3X) de LPBM o solución salina (grupo control) y a las 24 hs desafiadas vía i.n. con la MDL de Sp1 (3×10^6 UFC/50 μl). Las curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para cada grupo tratado se compararon respecto al grupo control mediante el test de Log-rank (Mantel-Cox), los asteriscos indican diferencias significativas (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.0001$. Resultados representativos de varios experimentos independientes.

En el caso del LBPA, la concentración a la cual obteníamos los preparados, no permitió administrar una dosis mayor. Si bien se podría recurrir a métodos de concentración, consideramos que esto conllevaría a una manipulación adicional del preparado, que además agregaría un paso más en la producción del lisado y que afectaría la reproducibilidad entre lotes.

En cambio, el LBPM se obtiene a una concentración adecuada para su uso, con alta preservación antigénica y una fácil reproducibilidad. Además como se observó, LBPA y LBPM mostraron una actividad inmunoestimulante muy similar tanto en las líneas reporteras como en pulmón y en BAL, a excepción de lo observado en la línea alveolar

donde LBPM fue superior. Por todo lo mencionado, consideramos que LBPM es el mejor candidato, pensando en su traslado al uso humano, por lo que de aquí en adelante se decidió utilizar el LBPM en los ensayos en el modelo murino.

Se decidió evaluar la ventana de tiempo de la protección inducida por el LBPM frente al desafío letal con Sp1. Se observó que la administración a las 72 y 48 hs pre-desafío también confirió protección y en un alto porcentaje (Figura 21). Sin embargo, el pre-tratamiento con LBPM 24 hs antes del desafío es el que brinda mayor protección.

De manera similar, se reportó que el pre-tratamiento entre 4 y 24 hs con un lisado bacteriano es óptimo para conferir protección frente a un desafío letal con *S. pneumoniae* serotipo 4 [81]. Cabe destacar que en ese trabajo realizan el pre-tratamiento y el desafío vía aerosol, lo cual es menos invasivo para el animal. En nuestro caso, donde el animal debe ser anestesiado previo a la administración i.n., consideramos que el lapso de 24 hs es ideal para la recuperación del animal, y como se ha observado, también para conferir protección.

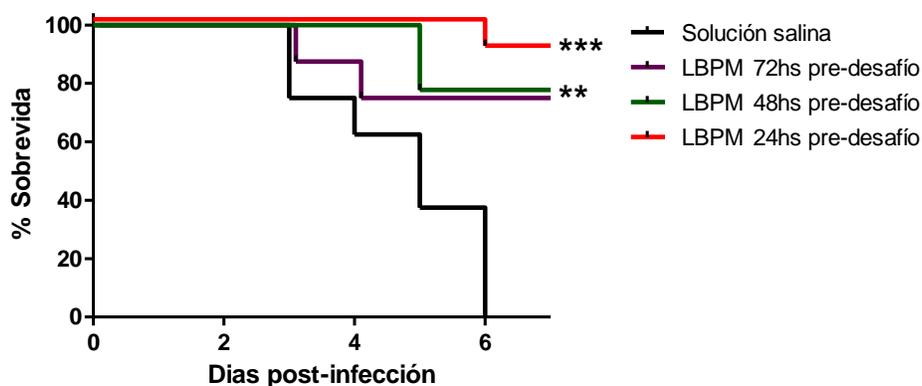


Figura 21. Protección frente a *S. pneumoniae* serotipo 1 inducida por el tratamiento i.n. con LBPM. Hembras C57BL/6 (n=6) inoculadas vía i.n. con LBPM (18 $\mu\text{g}/30 \mu\text{l}$) 72, 48 o 24 hs antes del desafío vía i.n. con la MDL de Sp1 (3×10^6 UFC/50 μl). El grupo control recibió solución salina 24 hs antes del desafío. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo tratado se compararon respecto al grupo control mediante el test de Log-rank (Mantel-Cox), se indican las diferencias significativas para (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.0001$. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Nuestro grupo ha trabajado con un extracto bacteriano, utilizando el esquema de 3 dosis previas al desafío letal con Sp1, observando protección completa [71]. Pero nuevamente, aquí logramos una alta protección y reproducibilidad con una sola dosis de lisado bacteriano polivalente, demostrando que es un potente inmunoestimulante.

En este sentido, otros autores habían mostrado que la protección conferida por un lisado bacteriano frente a la infección por *P. aureginosa*, no se modificaba por un tratamiento repetitivo, sino que una sola dosis alcanzaba para brindar una protección robusta [98].

IV.3.3.1. Impacto del tratamiento con el lisado bacteriano en la carga bacteriana presente en broncoalveolos, nasofaringe y bazo

Al comprobar que el lisado bacteriano polivalente es capaz de proteger frente a una infección letal con Sp1, se buscó investigar el impacto de esta protección en términos de carga bacteriana del patógeno en distintos órganos o tejidos del animal protegido. Los animales tratados con el LBPM que sobrevivieron al desafío letal con Sp1, no presentaron ningún signo de enfermedad, al menos hasta el día 7 post-infección. En ese momento se realizó su sacrificio y se evaluó la carga bacteriana en el bazo, en los lavados nasofaríngeos (NAL) y en BAL. Los ratones del grupo control que recibieron como tratamiento solución salina, murieron al cabo del día 5, por lo que no pudieron ser evaluados en paralelo.

No se detectaron bacterias viables de Sp1 en ninguna de las muestras de BAL ni de bazo de los animales protegidos al día 7 post-infección. Esto indica que los animales sobrevivieron porque son capaces de eliminar eficientemente Sp1 del pulmón, sin llegar al torrente sanguíneo. Otros autores ya han mostrado esta co-relación entre la supervivencia y la rápida eliminación de la carga bacteriana en pulmón [81]. Se ha sugerido entonces, que el ambiente microbicida inducido por el lisado bacteriano es el responsable de eliminar rápidamente las bacterias que entran a los pulmones, evitando que lleguen a compartimientos internos o vasculares, impidiendo su diseminación a la circulación sanguínea lo que provocaría una infección invasiva y letal.

Los animales protegidos, analizados al día 7 post-infección, mostraron una nasofaringe colonizada por Sp1 con un recuento del orden de 10^4 UFC/ml, mientras que al día 15, se

observó una significativa disminución, siendo de 10^3 UFC/ml. Cuando se trabaja con el modelo de colonización nasofaríngea, se utiliza un volumen menor de inóculo (10 μ l) para que éste permanezca en nasofaringe y no alcance los pulmones. Sin embargo, estos datos sugieren que cuando se administra un volumen mayor (30 μ l), si bien las bacterias alcanzan el pulmón, algunas también son capaces de colonizar la nasofaringe y permanecer allí, aun cuando fueron completamente eliminadas del pulmón, como se observó al día 7.

IV.3.3.2. Evaluación del efecto de *Il17a* en la protección frente a *S. pneumoniae*

Buscando identificar algún intermediario celular clave, se observó que *Il17a* fue una de las citoquinas que se mantuvo elevada a las 4 y 24 hs en los pulmones, luego de la administración vía i.n. de los lisados bacterianos (Figura 17). Además en trabajos previos de nuestro grupo de investigación, se había visto que la expresión de esta citoquina estaba significativamente aumentada en animales que sobreviven a la infección letal por Sp1 [87]. Por esto se decidió evaluar la participación de *Il17a* en la protección inducida por el lisado bacteriano frente al desafío letal, utilizando ratones deficientes para este gen (*Il17a*^{-/-}).

Los animales *Il17a*^{-/-} tratados con el lisado y desafiados 24 hs después con la MDL de Sp1, mostraron igual sobrevivencia (90%) que los wt tratados y desafiados en paralelo (Figura 22). Este resultado sugiere que si bien *Il17a* es clave en la infección por *S. pneumoniae*, y se ha sugerido un perfil de respuesta Th1/Th17 para la protección mediada por un lisado bacteriano [71], esta citoquina por sí misma, no es imprescindible en la protección inducida frente al desafío letal por Sp1.

Se debe considerar que *Il17a* pertenece a una familia de varias isoformas, y en particular se encuentra *Il17f*, con quien comparte la mayor homología y que podría cumplir funciones similares en ausencia de *Il17a* [99]. Por eso, podríamos no estar viendo diferencias debido a que *Il17f* podría estar sustituyendo su función. Es por esto, que consideramos que para comprobar estos resultados se podrían utilizar ratones deficientes

para el receptor IL-17 (IL17- RA), que una ambas citoquinas, y de esa forma confirmar o descartar completamente la eventual participación de estas citoquinas en la protección inducida por el lisado bacteriano.

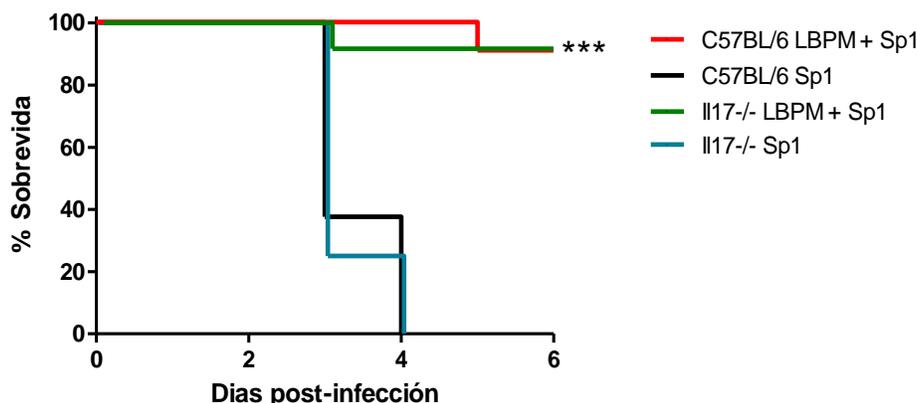


Figura 22. Protección frente a *S. pneumoniae* serotipo 1 inducida por el tratamiento i.n. con LBPM en ratones *Il17 α ^{-/-}*. Hembras C57BL/6 wt e *Il17 α ^{-/-}* fueron inoculadas vía i.n. con LBPM (18 μ g/30 μ l) o solución salina (grupos controles) y 24 hs después desafiadas vía i.n. con la MDL de Sp1 (3×10^6 UFC/50 μ l). La curva de sobrevivida de Kaplan-Meier para cada grupo tratado fue comparada respecto a los grupos control mediante el test de Log-rank, se indican diferencias significativas (***) para $p < 0.0001$. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

IV.3.3.3. Evaluación del rol de los neutrófilos en la protección frente a *S. pneumoniae*

Para evaluar el rol de los neutrófilos en la protección generada por los lisados, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Gr1, que ya ha sido utilizado por nuestro grupo de investigación para la depleción de neutrófilos [86]. En primer lugar, se verificó la depleción en el modelo de trabajo eligiéndose el punto de 24 hs post-tratamiento con el lisado, para controlar si la población de neutrófilos había sido eficientemente eliminada. Para esto, se administró el anticuerpo anti-Gr1 por ruta i.p., 12 hs después se administró LBPM y luego de 24 hs los animales se sacrificaron y se analizó por citometría de flujo la presencia de neutrófilos en sangre. Los resultados confirmaron que el esquema de administración y la dosis de anticuerpo fueron adecuados, ya que más del 99% de los neutrófilos se

encontraban depletados a nivel de circulación periférica, comparado con el grupo control, que recibió la misma dosis de un anticuerpo control de igual isotipo (Figura 23).

Luego, siguiendo el esquema de administración puesto a punto, los ratones se desafiaron con Sp1, y se evaluó su sobrevivencia (Figura 24). No se observaron diferencias significativas en la sobrevivencia, luego del desafío letal con Sp1, entre los animales que recibieron el anticuerpo anti-Gr1 o los que recibieron el anticuerpo control. Ambos grupos mostraron una sobrevivencia mayor al 75%, los ratones lucieron saludables, incluso en los primeros días, y recién se observaron signos de desmejora al día 5, en los animales que luego murieron.

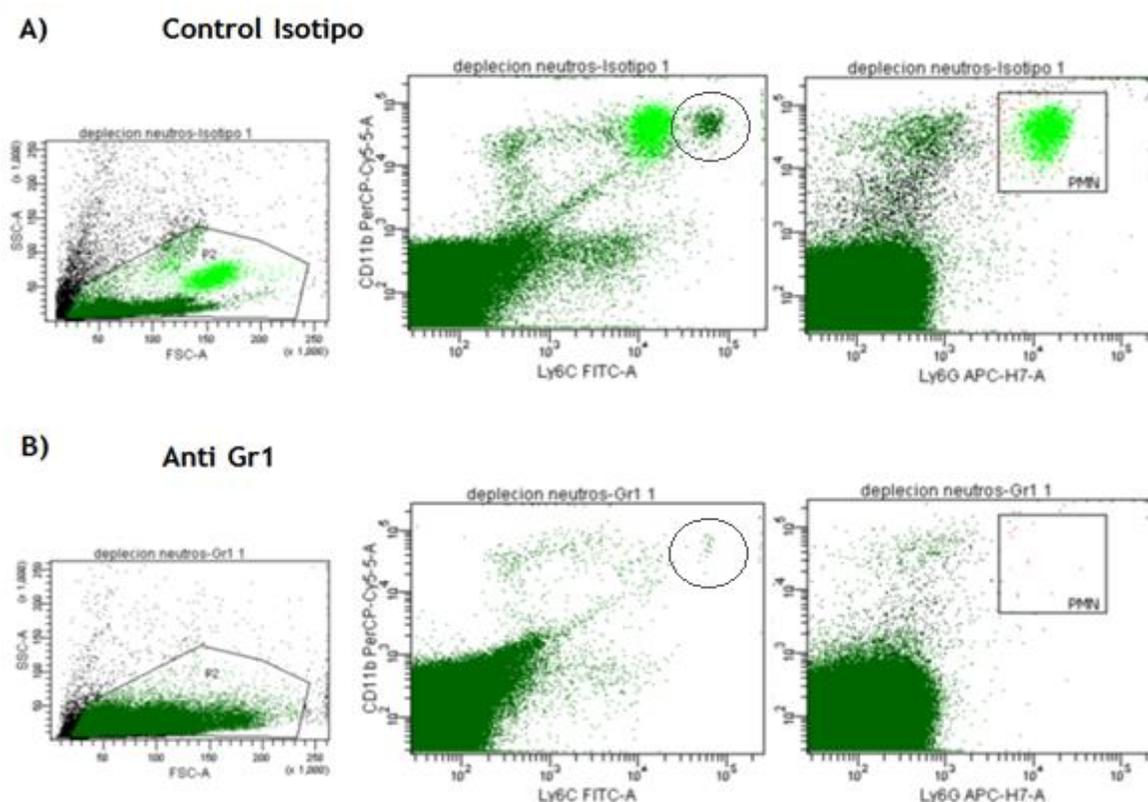


Figura 23. Depleción de células Gr1+. Hembras C57BL/6 (n=3) recibieron vía i.p. 100 μ g de anticuerpo control de isotipo (Panel A) o anticuerpo monoclonal anti-Gr1 (Panel B); a las 12 hs recibieron vía i.n. LBPM (18 μ g/30 μ l) y 24 hs después se les extrajo sangre periférica para comprobar la eficacia de la depleción. En la parte derecha de cada panel se muestra el gráfico de FSC vs. SSC y en la parte izquierda de cada panel se muestran dos combinaciones de anticuerpos para definir los neutrófilos (PMN): CD11b⁺/Ly6C⁺ y CD11b⁺/Ly6G⁺.

El anticuerpo anti-Gr1 (clona RB6-85C), ha sido extensamente usado para ensayos de depleción, pero como se mencionó, Gr1 no se encuentra exclusivamente en la superficie celular de neutrófilos. El anticuerpo anti-Gr1 reconoce los antígenos Ly6G y Ly6C y se ha demostrado que no solo depleta neutrófilos, sino también otras poblaciones de células Ly6G/C⁺ (Gr1⁺) como son los monocitos y macrófagos, ya que Ly6C se encuentra en la superficie de estos tipos celulares [100]. Como se observa en la Figura 23, en nuestro caso, se ve una población importante en el control de isotipo que es CD11b⁺/Ly6C⁺/Ly6G⁺, que en el grupo que recibió el anti-Gr1 se encuentra depletada. Se puede observar también una población pequeña que es CD11b⁺/Ly6C⁺ (indicada con un círculo), que en el grupo que recibió anti-Gr1 no aparece. Esto indica que el anticuerpo utilizado además de neutrófilos, también depleta otras poblaciones de células en la circulación sanguínea que son CD11b⁺/Ly6C⁺ pero no Ly6G⁺, que se presume serían monocitos circulantes e incluso una subpoblación de macrófagos, como había sido reportado previamente utilizando RB6-85C en ensayos de depleción en un modelo murino [100].

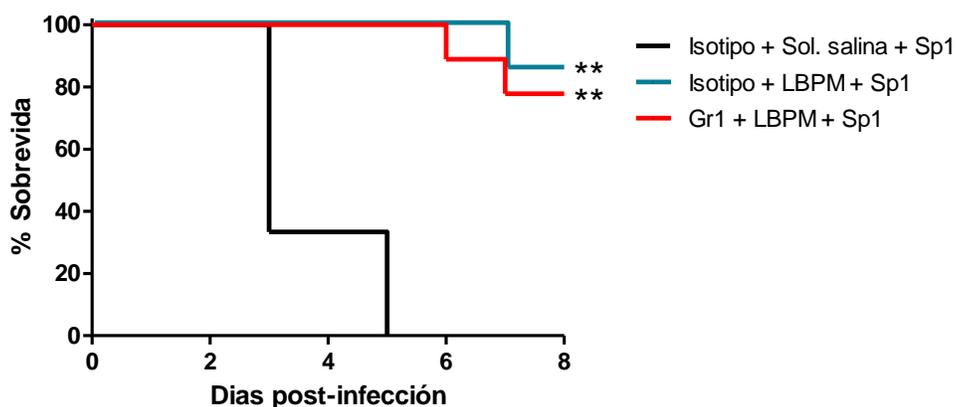


Figura 24. Efecto de la depleción de células Gr1⁺ en la protección frente al desafío letal con *S. pneumoniae*. Hembras C57BL/6 recibieron vía i.p. 100 µg de anticuerpo monoclonal anti Gr-1 o anticuerpo control de Isotipo; a las 12 hs vía i.n. LBPM (18 µg/30 µl) y 24 hs después la MDL de Sp1 (3x10⁶ UFC/50 µl). Un grupo recibió el anticuerpo control de Isotipo y como tratamiento, solución salina. La curva de supervivencia de Kaplan-Meier de cada grupo tratado se comparó con el grupo control (test de Log-rank), los asteriscos (**) indica diferencias significativas (p<0.001). Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Estos resultados muestran que a pesar de ser reclutados rápidamente y en gran cantidad (Figura 16), los neutrófilos no son necesarios para la protección conferida por el lisado bacteriano. Además otras células Gr1⁺, como los monocitos circulantes, tampoco parecen ser imprescindibles en la protección.

IV.3.3.4. Evaluación de la influencia de la activación del inflammasoma en la protección frente a *S. pneumoniae*

Por otro lado, se decidió evaluar si la activación de el/los inflammasomas jugaba un rol importante en la protección inducida por LBPM frente al desafío letal de Sp1. Para ello se utilizaron ratones deficientes en Caspasa-1 (*Casp1*^{-/-}), enzima que inicia la formación del complejo inflammasoma. Los ratones fueron tratados por ruta i.n con el LBPM y desafiados, 24 hs después, con la MDL de Sp1 (Figura 23).

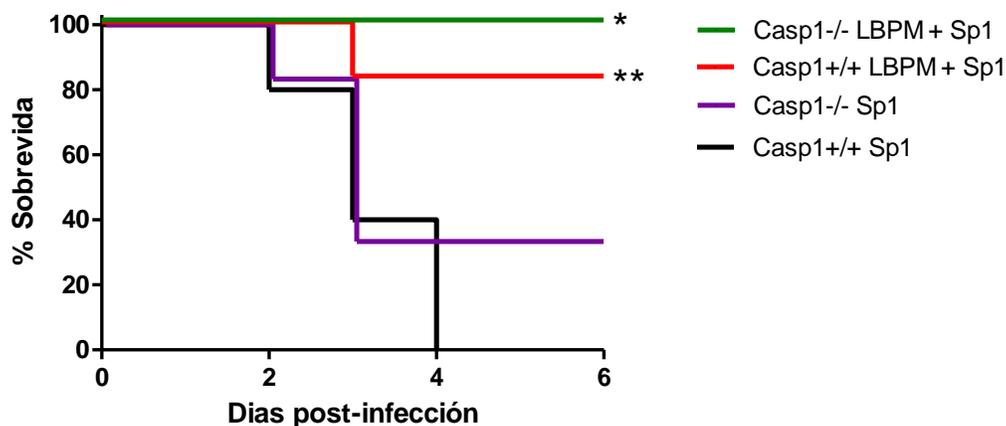


Figura 23. Protección frente a *S. pneumoniae* en ratones *Casp1*^{-/-} inducida por el tratamiento con el lisado bacteriano polivalente. Se utilizaron hembras *Casp1*^{-/-} y wt “littermate” de *Casp1* (*Casp1*^{+/+}) que fueron inoculadas vía i.n. con LBPM (18 µg/30 µl) o solución salina (grupos controles) y 24 hs después desafiadas vía i.n. con la MDL de Sp1 (3x10⁶ UFC/50 µl). La curva de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo tratado fue comparada respecto a su grupo control mediante el test de Log-rank, los asteriscos (**) indican diferencias significativas para p<0.001 y (*) para p<0.01. Resultados representativos de tres experimentos independientes.

Los ratones *Casp1*^{-/-} tratados con el lisado, mostraron un 100% de supervivencia frente al desafío letal con Sp1, mientras que los animales wt (*Casp1*^{+/+}), también tratados con LBPM, mostraron una supervivencia del 80%. En el caso de los animales que solo recibieron solución salina, también se pudo comprobar una mayor supervivencia en el caso de los *Casp1*^{-/-} en comparación con los wt, lo que sugiere una mayor resistencia a la infección por *S. pneumoniae* en ausencia de Caspasa-1.

Previamente, había sido establecida la importancia de la activación de los inflammasomas en la infección por *S. pneumoniae*, mostrando la dependencia entre su exotoxina PLY y la activación de la Caspasa-1 con la subsiguiente inducción de IL-1 y el desarrollo de un contexto pro-inflamatorio, necesario para contener la infección por parte del huésped [101], [102]. Más recientemente, se reportó que la ausencia del inflammasoma NLRP3 era beneficioso para contener la infección, ya que ratones deficientes de NLRP3 y ASC mostraron resistir mejor a la infección letal por *S. pneumoniae* serotipo 3 [103], de forma similar a lo aquí observado con el serotipo 1. Sin dudas estas observaciones requieren una mayor investigación sobre la activación y las respuestas generadas por parte de los inflammasomas frente al reconocimiento de *S. pneumoniae* u otro agente bacteriano.

De todas formas, nuestros resultados sugieren que la protección inducida por el lisado bacteriano frente al desafío con *S. pneumoniae* no requiere de la enzima Caspasa-1 ni de la subsecuente activación del inflammasoma.

IV.3.3.5. Evaluación de la fracción proteica de los lisados bacterianos en la protección frente a *S. pneumoniae*

Se había visto en los ensayos *in vitro* en la línea RAW-Blue, que al hidrolizar las proteínas de los lisados bacterianos, éstos mostraban el mismo grado de estimulación que los lisados que contenían sus proteínas íntegras (Figura 12). Por tanto, decidimos evaluar *in vivo*, el efecto de la hidrólisis de las proteínas en la protección inducida por LBPM frente al desafío letal con Sp1.

No se observó diferencia en la supervivencia de los ratones tratados con el lisado con sus proteínas íntegras o con el lisado que tiene sus proteínas hidrolizadas (Figura 26). Es decir

que, así como los ligandos proteicos no participan en el reconocimiento por receptores celulares ni en la activación de NF- κ B, tampoco influyen en la protección generada por el lisado frente al desafío letal. Esto sugiere una directa relación entre el reconocimiento y activación por parte de los PRRs y la respuesta de resistencia inducida por el lisado bacteriano.

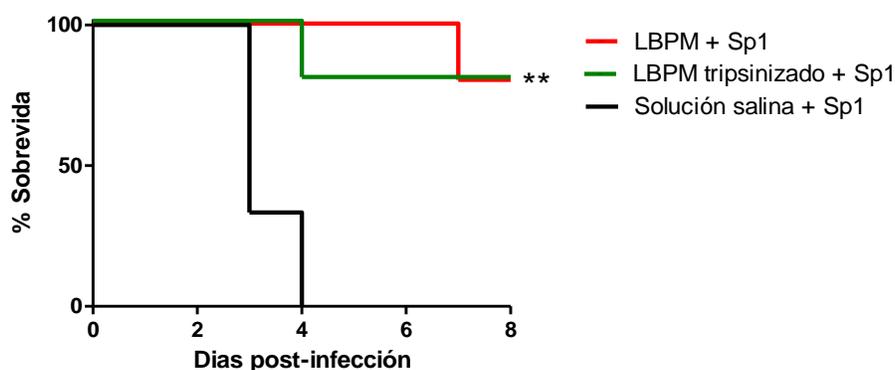


Figura 26. Efecto de la tripsinización en la protección mediada por el lisado polivalente frente al desafío letal con *S. pneumoniae*. Se utilizaron hembras C57BL/6 (n=6) inoculadas vía i.n. con LBPM (18 μ g/30 μ l) o LBPM tripsinizado y 24 hs después desafiadas vía i.n. con la MDL de Sp1 (3×10^6 UFC/50 μ l). También se utilizó un grupo control que recibió como tratamiento solución salina. La curva de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo tratado fue comparada respecto al grupo control mediante el test de Log-rank, los asteriscos (**) indican diferencias significativas ($p < 0.001$). Resultados representativos de dos experimentos independientes.

IV.3.4. Caracterización de poblaciones de células T presentes en pulmón luego del desafío

Por último, nos propusimos estudiar las diferentes poblaciones de células T presentes en el pulmón de los ratones que fueron tratados con el lisado polivalente y que sobrevivieron al desafío letal con *S. pneumoniae*. Se ha reportado la importancia de las poblaciones de células T en el mantenimiento de la homeostasis del pulmón. Éstas son distintas a las células T de la circulación sanguínea en términos de adhesión, activación y expresión de receptores y están involucradas en la defensa contra patógenos, siendo su localización en el pulmón clave para la vigilancia del sistema inmune [104].

IV.3.4.1. Células T de memoria

Buscamos caracterizar las poblaciones de células T de memoria, y en particular el linaje de células T de memoria residentes de tejido (T_{RM}), en este caso del pulmón. Las T_{RM} son poblaciones de expansión clonal de células T de memoria que residen en el tejido, se mantienen independientes de las células T linfoides o circulantes y tienen la habilidad de responder rápidamente a su antígeno específico [105]. Poseen moléculas de superficie específicas para su mantenimiento en el tejido, que pueden ser usadas para su identificación por citometría de flujo. La lectina CD69 es un marcador de las células T_{RM} expresadas en varios tejidos [105] y en particular las T_{RM} de pulmón expresan constitutivamente altos niveles de CD69, mientras que las células T linfoides o circulantes, muestran bajos niveles de CD69 [106].

En primer lugar, se puso a punto la fenotipificación de células T de memoria por citometría de flujo. Se evaluaron varios anticuerpos monoclonales específicos, que se combinaron para definir las poblaciones de interés, teniendo en cuenta a que fluorocromos estaban conjugados y como marcaron en la prueba de puesta a punto, llegando a la definición de un panel específico (Tabla 5). Este panel permite diferenciar las poblaciones de células T naïve, T de memoria central (T_{CM}), T de memoria efectoras (T_{EM}) y T_{RM} . El panel incluye CD69 como marcador de células T_{RM} , CD44 como marcador de células

T que fueron expuestas al antígeno, es decir que está presente en todas las células T activadas [107], y permite diferenciar a las células T naïve. También incluye al receptor CD62L, presente en las T_{CM} que permanecen en el ganglio linfático, mientras que las células T_{EM} circulantes y T_{RM} pierden este receptor al activarse y diferenciarse [107].

Tabla 5. Panel para la caracterización de células T por citometría de flujo: anticuerpos monoclonales de superficie conjugados a sus fluorocromos correspondientes, y su presencia (+) o ausencia (-) en las poblaciones de interés.

Fluorocromo	Anticuerpo	Naïve	Poblaciones de células T		
			T _{CM}	T _{EM}	T _{RM}
FITC	CD44	-	+++	+++	++
PE	CD69	-	-	-	+++
PerCP	CD3				
PE-Cy7	CD8				
APC	CD62L	+	++	-	-
APC-Cy7	CD4				

A continuación, se utilizó dicho panel (Tabla 5) para evaluar las poblaciones presentes en el pulmón de los animales protegidos, sacrificados 17 días después del desafío con Sp1, en comparación con las poblaciones presentes en animales naïve. Como se observa (Figura 27, A) el grupo de ratones naïve contiene una cantidad basal de células T (CD3⁺), CD4⁺ y CD8⁺, comparable con la cantidad presente en el grupo que recibió el lisado y sobrevivió al desafío letal. En relación con ello, tampoco se observaron diferencias en la cantidad de células CD3⁺CD4⁺ o CD3⁺CD8⁺. Por otro lado, los resultados revelan que el grupo que sobrevivió al desafío letal tiene una población de células T_{RM}, definidas de acuerdo al panel descrito (CD44⁺CD62L⁻CD69⁺). Se observó una tendencia a una mayor cantidad de estas células en el grupo protegido con respecto al grupo naïve, aunque sin significancia estadística (Figura 27, B). Una de las mayores dificultades encontradas en este ensayo, fue la gran variación en cantidad de células que mostraron los ratones naïve en los distintos experimentos. Cabe destacar, que como se comentó CD69 es un marcador específico de T_{RM}, por lo que encontrar una población con esta marca, habla de la generación de células T de memoria tras el encuentro con *S. pneumoniae*. Tomando estos datos en conjunto,

podemos afirmar que aunque el grupo que sobrevivió al desafío letal no presentó diferencias en el número total de células T CD3⁺ en comparación con el grupo naïve, sin embargo contiene una población de células T fenotípicamente diferente. Posee mayor cantidad de células T que son positivas para los marcadores que indican su posible activación, proliferación y maduración hacia un fenotipo de memoria. Las células T_{RM} encontradas fueron CD4⁺, no se observó la presencia de células T CD8⁺ con el perfil de T_{RM} en ninguno de los grupos.

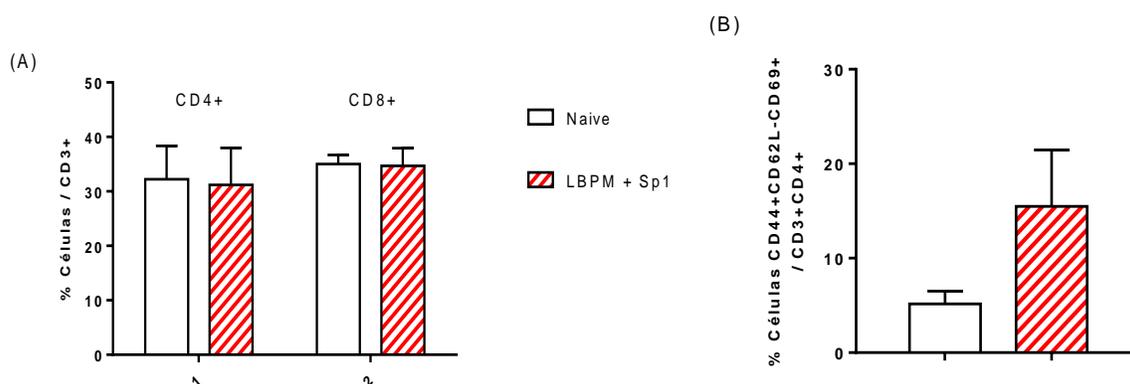


Figura 27. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de células T presentes en pulmón. Hembras C57BL/6 se inocularon vía i.n. con 6 µg/30 µl de LBPM y 24 hs después se desafiaron con la MDL de Sp1 (3x10⁶ UFC/50 µl). A los 17 días post-infección se sacrificaron y se extrajeron pulmones. Se utilizó un grupo de ratones naïve como control. (A) Poblaciones de células CD4⁺ y CD8⁺ definidas dentro de las células CD3⁺. (B) Células T_{RM} definidas como CD44⁺CD62L⁻CD69⁺, en el total de linfocitos CD4⁺ (linfocitos CD3⁺CD4⁺). Las barras representan la media ± SEM (n=6) de cada condición. Resultados representativos de dos experimentos independientes.

Otros estudios han reportado la generación de células CD4⁺ de memoria en pulmón, tras la inmunización i.n. con un antígeno de *B. anthracis*. En dicho trabajo esa población, que mostró niveles similares a los encontrados en nuestro trabajo, no mostró diferencias con el grupo control, a excepción de cuando se utilizó un adyuvante. Igualmente allí no se encontraron células CD8⁺ con fenotipo de memoria [108]. De forma similar, en un modelo de inmunización con 2 cepas de *S. pneumoniae*, se observó en pulmón una importante población de células CD4⁺ con altos niveles de CD44, pero tampoco se encontraron células CD8⁺ con ese fenotipo [109].

En suma, nuestros resultados sugieren la presencia de una mayor cantidad de células T CD4⁺ con fenotipo de memoria residentes de pulmón, en los ratones que recibieron el LBPM y luego el desafío letal, en comparación a los animales naïve. Se realizó también el análisis del perfil transcripcional por qRT-PCR de los pulmones (Figura 28). Se observó que los animales protegidos presentaron un aumento significativo en los niveles relativos de ARNm para *Il17a*, respecto al grupo naïve. Ha sido previamente establecida esta relación entre las células CD4⁺ e *Il17a* en modelos de infección de *S. pneumoniae* [87], [110]. Por lo tanto, podemos presumir que serían las células CD4⁺, en particular el tipo Th17 las que producen *Il17a*, aunque con los ensayos que realizamos aquí no lo podemos confirmar. Otra citoquina relacionada, que puede ser producida por células T como es *Ifng*, mostró leves diferencias, pero significativas respecto al control.

IV.3.4.2. Células T reguladoras

Dentro de las células T, otro fenotipo que buscamos fue el de las células T reguladoras (Tregs), subpoblación de células CD4⁺ que participa en la supresión o regulación de la respuesta inmune. Se caracterizan por expresar la cadena α del receptor de IL-2, CD25 y la expresión específica del factor de transcripción Foxp3 [111].

En modelos murinos se ha establecido la relación directa entre las células Tregs y la resolución de la inflamación a nivel de pulmón [112]. Utilizando como tratamiento un lisado bacteriano comercial en un modelo murino de asma, se ha reportado la presencia de una población de células CD4⁺Foxp3⁺ en pulmón, acompañado de una disminución de la inflamación [73], pero no ha sido reportada la presencia de Tregs trabajando con lisados bacterianos en modelos de infección por patógenos respiratorios, como es nuestro caso.

Para poder identificar esta población por citometría de flujo se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos de superficie CD3, CD4 y CD25, en conjunto con anticuerpos contra el factor de transcripción Foxp3 que requiere de una marcación intranuclear. Para el análisis se utilizaron las mismas muestras de pulmón en las que se identificaron las T_{RM} (IV.3.4.1). En el caso de las Tregs, el marcado de anticuerpos no

resultó exitoso, no se obtuvieron células con una marcación positiva para CD25, aunque se aumentará la concentración del anticuerpo utilizado. Por lo que el análisis fue trabajoso, no se pudieron detectar células CD4⁺CD25⁺, y no fue posible encontrar el fenotipo de células Tregs buscado CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

En los resultados de las qPCR se observó un aumento leve, aunque significativo de los niveles relativos de *Foxp3*, importante en el desarrollo de respuestas T reguladoras, pero este no se vio acompañado de citoquinas claves producidas por las Tregs como *Il10* o *Tgfb* (Figura 28). Esto tomado en conjunto con los resultados de citometría, parece indicar, que los pulmones de los ratones que sobreviven al desafío letal no tendrían un aumento significativo en la cantidad de células T reguladoras. De todas formas, consideramos que el análisis de Tregs no resultó exitoso, y se debería rever su puesta a punto.

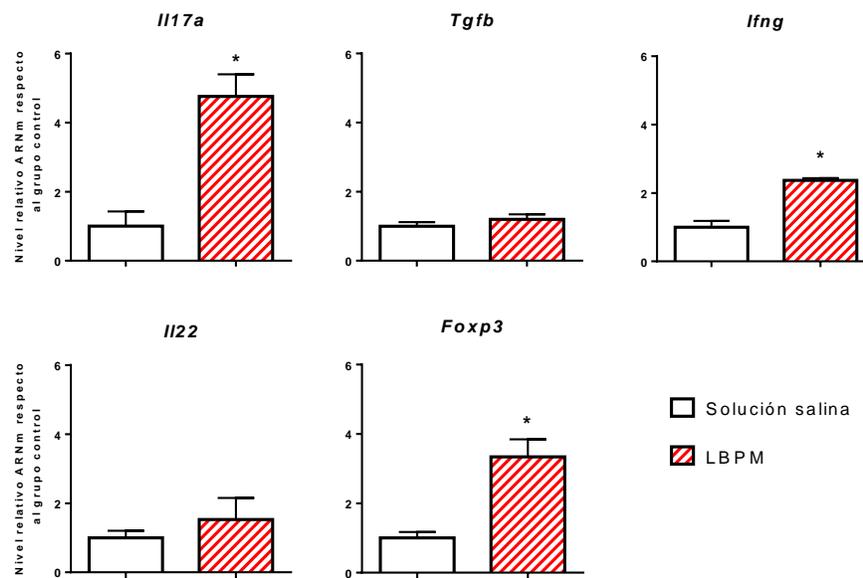


Figura 28. Evaluación del perfil transcripcional por qPCR en pulmones 17 días post-desafío letal. Hembras C57BL/6 recibieron vía i.n. 6 µg/30 µl de LBPM y 24 hs fueron desafiados por ruta i.n. con la MDL de Sp1. La cuantificación relativa se realizó por el método de ΔCt empleando el gen de la β -actina murino como housekeeping. Los resultados se muestran como incremento respecto al grupo control. Las barras representan la media \pm SEM (n=3) de cada condición. El asterisco (*) indica diferencias significativas para $p < 0.05$ determinadas mediante el test de ANOVA de una vía.

V. DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrollaron procesos de producción de lisados bacterianos mediante dos métodos de lisis: alcalina y mecánica. Los lisados obtenidos se compararon entre sí, caracterizando sus componentes y evaluando su actividad biológica mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, evaluando su uso terapéutico en un modelo de infección.

El desarrollo de dos metodologías de producción de un mismo lisado bacteriano polivalente y su comparación, es algo que no se había realizado previamente. Sí se había comprobado la superioridad de un lisado polivalente frente a uno monovalente en su actividad biológica *in vitro* [76]. Como se comentó, ha sido sugerido que los lisados producidos de forma mecánica son más inmunogénicos [55]. Aquí se comprobó que la conservación de las proteínas y carbohidratos en los lisados mecánicos es superior, y por su proceso desde el punto de vista químico, parece razonable asumir su superioridad frente a los lisados preparados por tratamiento alcalino. En cuanto a su actividad *in vitro*, ambos fueron capaces de estimular una línea celular alveolar, pero el LBPM produjo niveles de mediadores pro-inflamatorios significativamente mayores, mientras en las líneas de macrófagos y monocitos, la actividad de ambos lisados fue comparable. De forma similar, en el modelo murino, tanto la administración de LBPA como LBPM produjo en BAL y pulmón reclutamiento de neutrófilos y producción de mediadores pro-inflamatorios. Además ambos fueron capaces de generar sobrevida frente al desafío letal por Sp1. Concluimos entonces, que ambos lisados tienen el potencial de ser inmunoestimulantes, pero consideramos que el mecánico es más seguro al evitar procesos químicos y posibles modificaciones, lo cual es relevante si consideramos su eventual uso terapéutico en humanos.

Consideramos que es necesario avanzar en la caracterización e identificación de los componentes de los lisados bacterianos, para poder asegurar su reproducibilidad entre lotes y brindar seguridad al ser usados de forma terapéutica. Esto es algo que debe priorizarse para así ayudar en la implementación de su uso en humanos. Con este fin, se comenzó por cuantificar proteínas y carbohidratos, aunque no alcanzamos a definir con

exactitud todos sus otros componentes (lipídicos, ácidos nucleicos, por ej.). Sin embargo, consideramos que el uso de la técnica de MALDI-TOF como herramienta de caracterización, y la identificación de bio-marcadores, que permitirían evaluar la reproducibilidad entre lotes, constituye un aporte relevante de este trabajo y representa un gran avance en este sentido.

Los lisados bacterianos mostraron ser capaces de estimular *in vitro* células epiteliales, macrófagos y monocitos, y producir citoquinas, quimioquinas y péptidos antimicrobianos, iniciando rápidamente una respuesta pro-inflamatoria. Esto también se observó en los pulmones de los ratones que recibieron los lisados vía intranasal, y además en BAL se observó el aumento de poblaciones celulares como neutrófilos y macrófagos, claves para este contexto, y para la generación de una respuesta inmune. Se pudo comprobar entonces, la actividad biológica de nuestros lisados bacterianos, tanto *in vitro* como *in vivo*, con una sola dosis y en una baja concentración, en comparación con trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación [70], [71]. La ruta i.n. demostró ser una buena vía de administración de los lisados, el volumen administrado llega sin problemas a los pulmones y es capaz de causar allí su efecto. En este sentido, se ha reportado que otras vías de inmunización no logran el mismo efecto y es la estimulación de las defensas del pulmón la clave en la acción de los lisados bacterianos [81].

Sin embargo, en nuestro grupo se ha demostrado que la ruta sublingual, que se presenta como una vía segura y de fácil implementación, puede ser muy efectiva para la administración de inmunoestimulantes, generando una respuesta a nivel de pulmón y protección contra la infección por *S. pneumoniae* [86], [113]. Consideramos que sería relevante evaluar la efectividad de dicha ruta para la administración de los lisados bacterianos, pensando en su implementación para uso clínico.

Una clave en la acción inmunoestimulante de los lisados bacterianos es la interacción con los receptores de superficie celular, en particular por los TLRs, de células epiteliales, macrófagos, DC, etc., fundamental para el desarrollo de una respuesta inmune. Utilizando

las líneas reporteras se comprobó que los lisados bacterianos interactúan con los receptores tipo Toll de los macrófagos y monocitos, de manera MyD88-dependiente, provocando la activación de NF- κ B y/o AP-1 lo que lleva a la producción de mediadores pro-inflamatorios.

El grupo de Evans y colaboradores, comprobaron que se puede conferir la misma protección obtenida con un lisado bacteriano de NTHi, utilizando agonistas específicos de TLRs. Ningún agonista por sí solo logró proteger en la misma forma en un desafío letal, pero una combinación particular de agonistas de TLRs, TLR2/6 y 9, fue capaz de inducir un alto nivel de resistencia contra patógenos respiratorios como *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e influenza H1N1 [74], [114]. Como se discutió previamente, estos TLRs serían quienes participarían en mayor medida en el reconocimiento de los lisados bacterianos, siendo ligandos de glicolípidos y lipopéptidos (TLR2/6), componentes de las membranas bacterianas y del genoma bacteriano (TLR9). El otro TLR clave es el ligando de LPS, TLR4. Como se discutió en los ensayos de las líneas reporteras (IV.2.2), los lisados bacterianos interactúan con TLR4, pero el LPS (a una alta concentración) por sí solo no fue capaz de activar en tal magnitud NF- κ B, indicando que no es el único ligando de los lisados bacterianos reconocido por los TLRs. Además en los lisados bacterianos comerciales, se ha reportado que el LPS se encuentra en baja concentración [115] y que no es su “contaminación” la que influye en la acción de los lisados bacterianos [116]. En este trabajo, nos ha quedado pendiente la cuantificación de LPS en los distintos lisados formulados.

Se demostró la capacidad de los lisados bacterianos de proteger frente al desafío letal con *S. pneumoniae*, alcanzando niveles altos de protección con una alta reproducibilidad. Además, se comprobó que los ratones que sobreviven eliminan eficientemente *S. pneumoniae* de sus pulmones sin llegar al torrente sanguíneo y no padecen signos de enfermedad.

Tratando de ahondar en los mecanismos de acción de los lisados bacterianos, se evaluó el impacto de los neutrófilos en la protección frente al desafío letal. Los neutrófilos son

células claves que llegan rápidamente al pulmón, y cumplen un rol central en la respuesta inmune frente a la infección por varias bacterias patógenas, incluida *S. pneumoniae* [87], [117]–[119]. En nuestro modelo pudimos comprobar, que a pesar de ser reclutados rápidamente luego de la administración de los lisados bacterianos, los neutrófilos no son necesarios a la hora de conferir protección frente a Sp1. Esto posiciona a los lisados bacterianos como inmunoestimulantes y da pistas sobre su accionar. Los resultados indicarían que si bien logra activar muchos tipos celulares, no todos son necesarios, y que mantiene su acción a pesar de que no estén presentes células claves, como los neutrófilos u otras poblaciones como algunos tipos de monocitos o macrófagos Gr1⁺.

Tampoco influye la ausencia de la citoquina IL17-A, que es clave en la infección por *S. pneumoniae* [110], lo que sugiere que la protección que confiere LBPM no es específica para Sp1, y que podría proteger frente a otros agentes patógenos. Sería muy relevante poder evaluar la capacidad del LBPM de proteger frente a otros patógenos respiratorios, siendo esta una de las perspectivas para completar este trabajo.

La activación del/los inflamomas por la acción de los lisados bacterianos no había sido evaluada previamente. Aquí vimos que la ausencia de Caspasa-1 no tampoco influye en la protección frente a Sp1. Esto no quiere decir que no participen, sino más bien, indica que la actividad inmunoestimulante de los lisados bacterianos abarcaría varios tipos de células, mediadores celulares y moleculares o diferentes vías, que posiblemente al no estar presente alguno de ellos, igual se mantiene su acción.

Sabemos por nuestros resultados y lo reportado que MyD88 es clave para la acción de los lisados bacterianos, y por ende lo son los receptores tipo Toll MyD88-dependientes. Sumado a ello, nuestros datos muestran que no son fundamentales los neutrófilos o macrófagos. Entonces la clave en la inducción de la resistencia, parece estar en el epitelio pulmonar, siendo este el primero en interactuar, principalmente por medio de sus TLRs, con los lisados bacterianos y de esta forma iniciar la respuesta inmune. Se ha demostrado que las células epiteliales son capaces de generar un ambiente microbicida, y por sí solas

poder eliminar al agente infeccioso en horas [67], [98], [120]. El rol de las células epiteliales del tracto respiratorio en la defensa del organismo ha tomado relevancia. El epitelio pulmonar y su diversidad celular, plasticidad y su capacidad de secretar diferentes sustancias microbidas (péptidos antimicrobianos, mucinas, proteínas surfactantes, etc.) lo posiciona como el que dirige la respuesta inmune frente a microorganismos que ingresan por las vías aéreas [93], [121].

En conclusión, los lisados bacterianos producidos en este trabajo, poseen poderosos efectos inmunoestimulantes (activación de varios TLRs, producción de mediadores pro-inflamatorios, anti microbidas, interacción con distintos tipos celulares) y tienen el potencial de ser utilizados de forma terapéutica.

La aplicación de forma exitosa de estas terapias requiere una estimulación controlada y que no desencadene enfermedades inflamatorias o sepsis [122]. Se han evaluado potenciales estimulantes y moduladores de la inmunidad innata, principalmente enfocados en los TLRs (agonistas o antagonistas, según si se busca activar o suprimir mecanismos). Esta habilidad de modular la respuesta inmune puede resultar muy útil, no solo para tratar las ITRs, sino en diversos casos, como ser el control de enfermedades autoinmunes, alergia y como inmunoterapia antitumoral [16], [123], [124].

En el futuro, con los avances en la interacción con la microbiota pulmonar, la caracterización de los componentes de los lisados bacterianos y el refinamiento de sus mecanismos de acción, tal vez puedan identificarse moléculas claves que sean agonistas de determinados receptores y que puedan ser centrales en la prevención y tratamiento de las infecciones respiratorias.

VI. BIBLIOGRAFIA

- [1] P. G. Holt, D. H. Strickland, M. E. Wikström, and F. L. Jahnsen, "Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 2, pp. 142–152, 2008.
- [2] M. Hilty, C. Burke, H. Pedro, P. Cardenas, A. Bush, C. Bossley, J. Davies, A. Ervine, L. Poulter, L. Pachter, M. F. Moffatt, and W. O. C. Cookson, "Disordered microbial communities in asthmatic airways," *PLoS One*, vol. 5, no. 1, 2010.
- [3] E. S. Charlson, K. Bittinger, A. R. Haas, A. S. Fitzgerald, I. Frank, A. Yadav, F. D. Bushman, and R. G. Collman, "Topographical Continuity of Bacterial Populations in the Healthy Human Respiratory Tract," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 184, no. 8, pp. 957–963, Oct. 2011.
- [4] R. P. Dickson and G. B. Huffnagle, "The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease," *PLOS Pathog.*, vol. 11, no. 7, p. e1004923, 2015.
- [5] K. F. Budden, S. L. Gellatly, D. L. A. Wood, M. A. Cooper, M. Morrison, P. Hugenholtz, and P. M. Hansbro, "Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 15, no. 1, pp. 55–63, 2017.
- [6] R. Faner, O. Sibila, A. Agustí, E. Bernasconi, J. D. Chalmers, G. B. Huffnagle, C. Manichanh, P. L. Molyneaux, R. Paredes, V. P. Brocal, J. Ponomarenko, S. Sethi, J. Dorca, and E. Monso, "The microbiome in respiratory medicine: current challenges and future perspectives," *Eur Respir J*, vol. 49, pp. 2086–2016, 2017.
- [7] O. D. Chuquimia, D. H. Petursdottir, N. Periolo, and C. Fernández, "Alveolar Epithelial Cells Are Critical in Protection of the Respiratory Tract by Secretion of Factors Able To Modulate the Activity of Pulmonary Macrophages and Directly Control Bacterial Growth," *Infect. Immun.*, vol. 81, no. 1, pp. 381–389, 2013.
- [8] M. Kopf, C. Schneider, and S. P. Nobs, "The development and function of lung- resident macrophages and dendritic cells," *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 1, 2015.
- [9] M. A. Kovach and T. J. Standiford, "International Immunopharmacology Toll like receptors in diseases of the lung," *Int. Immunopharmacol.*, vol. 11, no. 10, pp. 1399–1406, 2011.
- [10] T. Kawasaki and T. Kawai, "Toll-like receptor signaling pathways," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. September, pp. 1–8, 2014.
- [11] R. Medzhitov, "Toll-like receptors and innate immunity," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 1, no. November, pp. 135–145, 2001.
- [12] M. Leissinger, R. Kulkarni, R. L. Zemans, G. P. Downey, and S. Jeyaseelan, "Investigating the role of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors in bacterial lung infection," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 189, no. 12, pp. 1461–1468, 2014.
- [13] L. Franchi, R. Muñoz-planillo, and G. Núñez, "Sensing and Reacting to Microbes via the Inflammasomes," *Nat. Immunol.*, vol. 13, no. 4, pp. 325–332, 2012.
- [14] J. J. Kim and E. K. Jo, "NLRP3 inflammasome and host protection against bacterial infection," *J. Korean Med. Sci.*, vol. 28, no. 10, pp. 1415–1423, 2013.

- [15] S. Pandey, T. Kawai, and S. Akira, "Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 7, pp. 1–18, 2015.
- [16] R. E. W. Hancock, A. Nijnik, and D. J. Philpott, "Modulating immunity as a therapy for bacterial infections," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 4, pp. 243–254, 2012.
- [17] J.-P. Allam, T. Bieber, and N. Novak, "Dendritic cells as potential targets for mucosal immunotherapy," *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 9, pp. 554–557, 2009.
- [18] J. M. Damsker, A. M. Hansen, and R. R. Caspi, "Th1 and Th17 cells: Adversaries and collaborators," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1183, pp. 211–221, 2010.
- [19] World Health Organization, "The World Health Report 2004: changing history," 2004.
- [20] Unicef; World Health Organization, "Pneumonia: The forgotten killer of children," 2006.
- [21] World Health Organization, "The top 10 causes of death," 2017.
- [22] C. L. F. Walker, I. Rudan, L. Liu, H. Nair, E. Theodoratou, Z. A. Bhutta, K. L. O'Brien, H. Campbell, and R. E. Black, "Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea," *Lancet*, vol. 381, no. 9875, pp. 1405–16, Apr. 2013.
- [23] World Health Organization, "Pneumonia. Fact sheet N° 331.," 2016.
- [24] G. Rodríguez, "Géneros Streptococcus y Enterococcus. Capítulo 17. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 3ª edición. Facultad de Medicina, UDELAR.," 2008, pp. 273–290.
- [25] T. van der Poll and S. M. Opal, "Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia," *Lancet*, vol. 374, pp. 1543–1556, 2009.
- [26] World Health Organization, "Global surveillance, prevention and control of Chronic respiratory Diseases. A comprehensive approach.," 2007.
- [27] K. F. Rabe, S. Hurd, A. Anzueto, P. J. Barnes, S. A. Buist, P. Calverley, Y. Fukuchi, C. Jenkins, R. Rodriguez-Roisin, C. Van Weel, and J. Zielinski, "Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 176, no. 6, pp. 532–555, 2007.
- [28] Z. Wang, M. Bafadhel, K. Haldar, A. Spivak, D. Mayhew, B. E. Miller, R. Tal-Singer, S. L. Johnston, M. Y. Ramsheh, M. R. Barer, C. E. Brightling, and J. R. Brown, "Lung microbiome dynamics in COPD exacerbations," *Eur. Respir. J.*, vol. 47, no. 4, pp. 1082–1092, 2016.
- [29] J. M. Leung, P. Y. Tiew, M. Mac Aogáin, K. F. Budden, V. F. L. Yong, S. S. Thomas, K. Pethe, P. M. Hansbro, and S. H. Chotirmall, "The role of acute and chronic respiratory colonization and infections in the pathogenesis of COPD," *Respirology*, 2017.
- [30] B. L. Barker, K. Haldar, H. Patel, I. D. Pavord, M. R. Barer, C. E. Brightling, and M. Bafadhel, "Association between pathogens detected using quantitative polymerase chain reaction with airway inflammation in COPD at stable state and exacerbations," *Chest*, vol. 147, no. 1, pp. 46–55, 2015.
- [31] M. Bafadhel, K. Haldar, B. Barker, H. Patel, V. Mistry, M. R. Barer, I. D. Pavord, and C. E.

- Brightling, "Airway bacteria measured by quantitative polymerase chain reaction and culture in patients with stable COPD: relationship with neutrophilic airway inflammation, exacerbation frequency, and lung function," *Int J Chron Obs. Pulmon Dis*, vol. 10, pp. 1075–1083, 2015.
- [32] J. Brown, S. Hammerschmidt, and C. Orihuela, *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE Molecular Mechanisms of Host-pathogen Interactions*. 2015.
- [33] D. Bogaert, R. De Groot, and P. W. M. Hermans, "Streptococcus pneumoniae colonisation Streptococcus pneumoniae colonisation : the key to pneumococcal disease," vol. 4, no. March, pp. 144–154, 2004.
- [34] A. Kadioglu, J. N. Weiser, J. C. Paton, and P. W. Andrew, "The role of Streptococcus pneumoniae virulence factors in host respiratory colonization and disease.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, no. 4, pp. 288–301, 2008.
- [35] B. Henriques-Normark and E. I. Tuomanen, "The pneumococcus: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 7, pp. 1–15, 2013.
- [36] A. M. Mitchell and T. J. Mitchell, "Streptococcus pneumoniae: Virulence factors and variation," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 16, no. 5, pp. 411–418, 2010.
- [37] A. Agrawal and T. F. Murphy, "Haemophilus influenzae Infections in the H. influenzae Type b Conjugate Vaccine Era," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 11, pp. 3728–3732, 2011.
- [38] J. D. Langereis and M. I. De Jonge, "Invasive disease caused by nontypeable Haemophilus influenzae," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 21, no. 10, pp. 1711–1718, 2015.
- [39] J. A. Lewnard, N. Givon-Lavi, A. Huppert, M. M. Pettigrew, G. Regev-Yochay, R. Dagan, and D. M. Weinberger, "Epidemiological Markers for Interactions among Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Staphylococcus aureus in Upper Respiratory Tract Carriage," *J. Infect. Dis.*, vol. 213, no. 10, pp. 1596–1605, 2016.
- [40] E. S. Lysenko, R. S. Lijek, S. P. Brown, and J. N. Weiser, "Within-host competition drives selection for the capsule virulence determinant of streptococcus pneumoniae," *Curr. Biol.*, vol. 20, pp. 1222–1226, 2010.
- [41] J. Lewnard, A. Huppert, N. Givon-Lavi, M. Pettigrew, G. Regev-Yochay, R. Dagan, and D. Weinberger, "Density, serotype diversity, and fitness of Streptococcus pneumoniae in upper respiratory co-colonization with nontypeable Haemophilus influenzae," *J. Infect. Dis.*, vol. 214, no. 9, pp. 1411–1420, 2016.
- [42] C. C. Daniels, P. D. Rogers, and C. M. Shelton, "A Review of Pneumococcal Vaccines : Current Polysaccharide Vaccine," *J Pediatr Pharmacol Ther*, vol. 21, no. 1, pp. 27–35, 2016.
- [43] L. A. Jackson, A. Gurtman, M. Van Cleeff, K. U. Jansen, D. Jayawardene, C. Devlin, D. A. Scott, E. A. Emini, W. C. Gruber, and B. Schmoele-thoma, "Immunogenicity and safety of a 13-valent pneumococcal conjugate vaccine compared to a 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine in pneumococcal vaccine-naive adults," *Vaccine*, vol. 31, no. 35, pp. 3577–3584, 2013.

- [44] PAHO, "Informe regional de SIREVA II, 2014. Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*, en procesos invasivos bacterianos. Washington, D.C.," 2014.
- [45] PAHO, "Informe Regional de SIREVA II, 2010: datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Washington, D.C.," 2010.
- [46] A. Horácio, "Serotype 3 Remains the Leading Cause of Invasive Pneumococcal Disease in Adults in Portugal (2012–2014) Despite Continued Reductions in Other 13-Valent Conjugate Vaccine Serotypes.," *Front. Microbiol.*, vol. 7, 2016.
- [47] C. Hays, Q. Vermeë, A. Agathine, A. Dupuis, E. Varon, C. Poyart, M.-C. Ploy, J. Raymond, and and the ORP Ile de France Ouest, "Demonstration of the herd effect in adults after the implementation of pneumococcal vaccination with PCV13 in children," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2016.
- [48] R. Malley, "Antibody and cell-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*: Implications for vaccine development," *J. Mol. Med.*, vol. 88, no. 2, pp. 135–142, 2010.
- [49] H. Peltola, "Worldwide *Haemophilus influenzae* Type b Disease at the Beginning of the 21st Century: Global Analysis of the Disease Burden 25 Years after the Use of the Polysaccharide Vaccine and a Decade after the Advent of Conjugates," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 13, no. 2, pp. 302–317, 2000.
- [50] M. Cazzola, P. Rogliani, S. Aliberti, F. Blasi, and M. G. Matera, "An update on the pharmacotherapeutic management of lower respiratory tract infections.," *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 12, no. 40, pp. 973–988, 2017.
- [51] B. Lee and H. W. Boucher, "Targeting antimicrobial-resistant bacterial respiratory tract pathogens," *Curr. Opin. Pulm. Med.*, vol. 21, no. 3, pp. 293–303, 2015.
- [52] C. Prat and A. Lacombe, "Bacteria in the respiratory tract-how to treat? Or do not treat?," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 51, pp. 113–122, 2016.
- [53] M. Cazzola, A. Capuano, P. Rogliani, and M. G. Matera, "Bacterial lysates as a potentially effective approach in preventing acute exacerbation of COPD," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 12, no. 3, pp. 300–308, 2012.
- [54] F. Braido, F. Tarantini, V. Ghiglione, G. Melioli, and G. W. Canonica, "Bacterial lysate in the prevention of acute exacerbation of COPD and in respiratory recurrent infections," *Int. J. COPD*, vol. 2, no. 3, pp. 335–345, 2007.
- [55] M. Cazzola, P. Rogliani, and G. Curradi, "Bacterial extracts for the prevention of acute exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease: A point of view," *Respir. Med.*, vol. 102, no. 3, pp. 321–327, 2008.
- [56] Farmanuario®, "Farmanuario® 2017," 2017. [Online]. Available: <http://farmanuario.uy>.
- [57] J. V. Jara-Pérez and A. Berber, "Primary Prevention of Acute Respiratory Tract Infections in Children Using a Bacterial Immunostimulant: A Double-Masked, Placebo-Controlled Clinical

Trial," *Clin. Ther.*, vol. 22, no. 6, 2000.

- [58] M. D. Gutiérrez-Tarango and A. Berber, "Safety and efficacy of two courses of OM-85 BV in the prevention of respiratory tract infections in children during 12 months," *Chest*, vol. 119, no. 6, pp. 1742–1748, 2001.
- [59] C. Steurer-stey, L. Lagler, D. A. Straub, J. Steurer, and L. M. Bachmann, "Oral purified bacterial extracts in acute respiratory tract infections in childhood: a systematic quantitative review," *Eur J Pediatr*, vol. 166, pp. 365–376, 2007.
- [60] U. B. Schaad, "OM-85 BV, an immunostimulant in pediatric recurrent respiratory tract infections: A systematic review," *World J. Pediatr.*, vol. 6, no. 1, pp. 5–12, 2010.
- [61] S. Carlone, M. Minenna, P. Morlino, L. Mosca, F. Pasqua, and R. Pela, "Clinical efficacy and tolerability of an immune-stimulant constituted by inactivated bacterial bodies in the prophylaxis of infectious episodes of airways: a double blind, placebo-controlled, randomized, multicentre study," *Multidiscip. Respir. Med.*, vol. 9, no. 58, 2014.
- [62] M. Solèr, R. Mütterlein, and G. Cozma, "Double-Blind Study of OM-85 in Patients with Chronic Bronchitis or Mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease," *Respiration*, vol. 74, pp. 26–32, 2007.
- [63] F. Braido, G. Melioli, M. Cazzola, L. Fabbri, F. Blasi, L. Moretta, and G. W. Canonica, "Sub-lingual administration of a polyvalent mechanical bacterial lysate (PMBL) in patients with moderate, severe, or very severe chronic obstructive pulmonary disease (COPD) according to the GOLD spirometric classification: A multicentre, double-blind, ran," *Pulm. Pharmacol. Ther.*, vol. 33, pp. 75–80, 2015.
- [64] H. Tang, Z. Fang, G. Saborío, and Q. Xiu, "Efficacy and Safety of OM-85 in Patients with Chronic Bronchitis and/or Chronic Obstructive Pulmonary Disease," *Lung*, 2015.
- [65] A. Roży and J. Chorostowska-wynimko, "Bacterial immunostimulants — mechanism of action and clinical application in respiratory diseases," *Pneumonol. Alergol. Pol.*, vol. 76, pp. 353–359, 2008.
- [66] M. Huber, "TH1-orientated immunological properties of the bacterial extract OM-85-BV," *Eur. J. Med. Res.*, vol. 10, pp. 209–217, 2005.
- [67] S. E. Evans, B. L. Scott, C. G. Clement, D. T. Larson, D. Kontoyiannis, R. E. Lewis, P. R. Lasala, J. Pawlik, J. W. Peterson, A. K. Chopra, G. Klimpel, G. Bowden, M. Hook, Y. Xu, M. J. Tuvim, and B. F. Dickey, "Stimulated innate resistance of lung epithelium protects mice broadly against bacteria and fungi," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 42, no. 1, pp. 40–50, 2010.
- [68] C. Parola, L. Salogni, X. Vaira, S. Scutera, P. Somma, V. Salvi, T. Musso, G. Tabbia, M. Bardessono, C. Pasquali, A. Mantovani, S. Sozzani, and D. Bosisio, "Selective activation of human dendritic cells by OM-85 through a NF- κ B and MAPK dependent pathway," *PLoS One*, vol. 8, no. 12, 2013.
- [69] H. Luan, Q. Zhang, L. Wang, C. Wang, M. Zhang, X. Xu, H. Zhou, X. Li, Q. Xu, F. He, J. Yuan, and Y. Lv, "OM85-BV Induced the Productions of IL-1 β , IL-6, and TNF- α via TLR4- and TLR2-Mediated ERK1/2/NF- κ B Pathway in RAW264.7 Cells," *J. Interf. Cytokine Res.*, vol. 34, no. 7,

pp. 526–536, 2014.

- [70] A. Rial, D. Lens, L. Betancor, H. Benkiel, J. S. Silva, and J. A. Chabalgoity, “Intranasal Immunization with a Colloid-Formulated Bacterial Extract Induces an Acute Inflammatory Response in the Lungs and Elicits Specific Immune Responses,” *Infect. Immun.*, vol. 72, no. 5, pp. 2679–2688, 2004.
- [71] A. Rial, F. Ferrara, N. Suárez, P. Scavone, J. M. Marqués, and J. A. Chabalgoity, “Intranasal administration of a polyvalent bacterial lysate induces self-restricted inflammation in the lungs and a Th1/Th17 memory signature,” *Microbes Infect.*, vol. 18, no. 12, pp. 747–757, 2016.
- [72] S. C. Kearney, M. Dziekiewicz, and W. Feleszko, “Immunoregulatory and immunostimulatory responses of bacterial lysates in respiratory infections and asthma,” *Ann. Allergy, Asthma Immunol.*, vol. 114, no. 5, pp. 364–369, 2015.
- [73] S. Navarro, G. Cossalter, C. Chiavaroli, A. Kanda, S. Fleury, A. Lazzari, J. Cazareth, T. Sparwasser, D. Dombrowicz, N. Glaichenhaus, and V. Julia, “The oral administration of bacterial extracts prevents asthma via the recruitment of regulatory T cells to the airways,” *Mucosal Immunol.*, vol. 4, no. 1, pp. 53–65, 2011.
- [74] J. M. Duggan, D. You, J. O. Cleaver, D. T. Larson, R. J. Garza, F. A. Guzman Pruneda, M. J. Tuvim, J. Zhang, B. F. Dickey, and S. E. Evans, “Synergistic interactions of TLR2/6 and TLR9 induce a high level of resistance to lung infection in mice,” *J Immunol*, vol. 186, no. 10, pp. 5916–5926, 2011.
- [75] G. Lanzilli, E. Traggiai, F. Braido, V. Garelli, C. Folli, A. Chiappori, A. M. Riccio, G. Bazurro, A. Agazzi, A. Magnani, G. W. Canonica, and G. Melioli, “Administration of a polyvalent mechanical bacterial lysate to elderly patients with COPD: Effects on circulating T, B and NK cells,” *Immunol. Lett.*, vol. 149, no. 1–2, pp. 62–67, 2013.
- [76] B. Morandi, A. Agazzi, A. D Agostino, F. Antonini, G. Costa, F. Sabatini, G. Ferlazzo, and G. Melioli, “A mixture of bacterial mechanical lysates is more efficient than single strain lysate and of bacterial-derived soluble products for the induction of an activating phenotype in human dendritic cells,” *Immunol. Lett.*, vol. 138, no. 1, pp. 86–91, 2011.
- [77] C. Zelle-Rieser, R. Ramoner, G. Bartsch, and M. Thurnher, “A clinically approved oral vaccine against pneumotropic bacteria induces the terminal maturation of CD83+ immunostimulatory dendritic cells,” *Immunol. Lett.*, 2001.
- [78] G. A. Rossi, C. Peri, M. E. Raynal, A. C. Defilippi, F. M. Risso, G. Schenone, E. Pallestrini, and G. Melioli, “Naturally occurring immune response against bacteria commonly involved in upper respiratory tract infections: Analysis of the antigen-specific salivary IgA levels,” *Immunol. Lett.*, vol. 86, no. 1, pp. 85–91, 2003.
- [79] W. G. Bessler, U. vor dem Esche, and N. Masihi, “The bacterial extract OM-85 BV protects mice against Influenza and Salmonella infection,” *Int. Immunopharmacol.*, vol. 10, no. 9, pp. 1086–1090, 2010.
- [80] F. Braido, G. Schenone, E. Pallestrini, G. Reggiardo, G. Cangemi, G. W. Canonica, and G. Melioli, “The relationship between mucosal immunoresponse and clinical outcome in

- patients with recurrent upper respiratory tract infections treated with a mechanical bacterial lysate," *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, vol. 25, no. 3, pp. 477–485, 2011.
- [81] C. G. Clement, S. E. Evans, C. M. Evans, D. Hawke, R. Kobayashi, P. R. Reynolds, S. J. Moghaddam, B. L. Scott, E. Melicoff, R. Adachi, B. F. Dickey, and M. J. Tuvim, "Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 177, no. 12, pp. 1322–1330, 2008.
- [82] M. J. Tuvim, S. E. Evans, C. G. Clement, B. F. Dickey, and B. E. Gilbert, "Augmented lung inflammation protects against influenza A pneumonia," *PLoS One*, vol. 4, no. 1, pp. 1–8, 2009.
- [83] E. Texeira, J. Checa, A. Ríal, J. A. Chabalgoity, and N. Suárez, "A new chemically defined medium for cultivation of *Streptococcus pneumoniae* Serotype 1," *J. Biotech Res.*, vol. 6, pp. 54–62, 2015.
- [84] N. Suarez, F. Ferrara, M. Piriz, A. Rial, and J. A. Chabalgoity, "Characterization of bacterial lysates by use of Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting," *SOJ Biochem*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2017.
- [85] G. Cuesta, N. Suarez, M. I. Bessio, F. Ferreira, and H. Massaldi, "Quantitative determination of pneumococcal capsular polysaccharide serotype 14 using a modification of phenol–sulfuric acid method," *J. Microbiol. Methods*, vol. 52, no. 1, pp. 69–73, 2003.
- [86] N. Muñoz, L. Van Maele, J. M. Marqués, A. Rial, J. C. Sirard, and J. A. Chabalgoity, "Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection," *Infect. Immun.*, vol. 78, no. 10, pp. 4226–4233, 2010.
- [87] J. M. Marqués, A. Rial, N. Muñoz, F. X. Pelay, L. Van Maele, H. Léger, T. Camou, J. C. Sirard, A. Benecke, and J. A. Chabalgoity, "Protection against *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 acute infection shows a signature of Th17- and IFN- γ -mediated immunity," *Immunobiology*, vol. 217, no. 4, pp. 420–429, 2012.
- [88] J. A. Bauer, M. Salvagni, L. Leon Vigroox, Jean-Pierre Chalvet, and C. Chiavaroli, "BACTERIAL EXTRACT FOR RESPIRATORY DISORDERS AND PROCESS FOR ITS PREPARATION. Pub. No.: US 2010/0227013 A1," 2010.
- [89] E. Villa, V. Garelli, F. Braidò, G. Melioli, and G. W. Canonica, "May We Strengthen the Human Natural Defenses with Bacterial Lysates?," *WAO J.*, vol. 3, pp. 17–S23, 2010.
- [90] N. Singhal, M. Kumar, P. K. Kanaujia, and J. S. Virdi, "MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis," *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. 791, 2015.
- [91] A. Croxatto, G. Prod'hom, and G. Greub, "Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology," *FEMS Microbiol.*, vol. 36, pp. 380–407, 2012.
- [92] M. Lieber, B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, and G. Todaro, "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II. alveolar epithelial cells," *Int. J. Cancer*, vol. 17, pp. 62–70, 1976.

- [93] R. Bals and P. S. Hiemstra, "Innate immunity in the lung: How epithelial cells fight against respiratory pathogens," *Eur. Respir. J.*, vol. 23, no. 2, pp. 327–333, 2004.
- [94] M. P. Rogan, P. Geraghty, C. M. Greene, S. J. O'Neill, C. C. Taggart, and N. G. McElvaney, "Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence.," *Respir. Res.*, vol. 7, p. 29, 2006.
- [95] S. W. Brubaker and D. M. Monack, "Microbial metabolite triggers antimicrobial defense," *Science (80-.)*, vol. 348, no. 6240, pp. 1207–1208, 2015.
- [96] R. G. Gaudet, A. Sintsova, C. M. Buckwalter, N. Leung, A. Cochrane, J. Li, A. D. Cox, J. Moffat, and S. D. Gray-Owen, "Cytosolic detection of the bacterial metabolite HBP activates TIFA-dependent innate immunity," *Science (80-.)*, vol. 348, no. 6240, pp. 1251–1255, 2015.
- [97] T. Seya, J. Kasamatsu, M. Azuma, H. Shime, and M. Matsumoto, "Natural Killer Cell Activation Secondary to Innate Pattern Sensing," *J. Innate Immun.*, vol. 8638, no. 3, pp. 264–273, 2011.
- [98] S. E. Evans, Y. Xu, M. J. Tuvim, and B. F. Dickey, "Inducible innate resistance of lung epithelium to infection.," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 72, pp. 413–435, 2010.
- [99] J. K. Kolls and A. Linden, "Interleukin-17 Family Members and Inflammation," *Immunity*, vol. 21, pp. 467–476, 2004.
- [100] J. M. Daley, A. A. Thomay, M. D. Connolly, J. S. Reichner, and J. E. Albina, "Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice of these cells in host defense . RB6-8C5 binds to," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 83, pp. 64–70, 2007.
- [101] S. Shoma, K. Tsuchiya, I. Kawamura, T. Nomura, H. Hara, R. Uchiyama, S. Daim, and M. Mitsuyama, "Critical Involvement of Pneumolysin in Production of Interleukin-1a and Caspase-1-Dependent Cytokines in Infection with *Streptococcus pneumoniae* In Vitro: a Novel Function of Pneumolysin in Caspase-1 Activation," *Infect. Immun.*, vol. 76, no. 4, pp. 1547–1557, 2008.
- [102] R. Fang, K. Tsuchiya, I. Kawamura, Y. Shen, H. Hara, S. Sakai, T. Yamamoto, T. Fernandes-Alnemri, R. Yang, E. Hernandez-Cuellar, S. R. Dewamitta, Y. Xu, H. Qu, E. S. Alnemri, and M. Mitsuyama, "Critical roles of ASC inflammasomes in caspase-1 activation and host innate resistance to *Streptococcus pneumoniae* infection," *J Immunol*, vol. 187, no. 9, pp. 4890–4899, 2011.
- [103] M. H. P. Van Lieshout, A. F. De Vos, M. C. Dessing, A. P. N. A. De Porto, O. J. de Boer, R. de Beer, S. Terpstra, S. Florquin, C. van t Verr, and T. van der Poll, "ASC and NLRP3 impair host defense during lethal pneumonia caused by serotype 3 *Streptococcus pneumoniae* in mice," *Eur. J. Immunol.*, 2017.
- [104] C. E. Day, C. Guillen, G. B. Willars, and A. J. Wardlaw, "Characterization of the migration of lung and blood T cells in response CXCL 12 in a three-dimensional matrix," *Immunology*, vol. 130, pp. 564–571, 2010.
- [105] D. L. Turner and D. L. Farber, "Mucosal resident memory CD4 T cells in protection and immunopathology," *Front. Immunol.*, vol. 5, pp. 1–10, 2014.

- [106] D. L. Turner, K. L. Bickham, J. J. Thome, C. Y. Kim, F. D. Ovidio, E. J. Wherry, and D. L. Farber, "Lung niches for the generation and maintenance of tissue-resident memory T cells," *Mucosal Immunol.*, vol. 7, no. 3, pp. 501–510, 2014.
- [107] B. J. G. Baaten, R. Tinoco, A. T. Chen, and L. M. Bradley, "Regulation of antigen-experienced T cells: Lessons from the quintessential memory marker CD44," *Front. Immunol.*, vol. 3, pp. 1–12, 2012.
- [108] S. J. Woo, S. S. Kang, S. M. Park, J. S. Yang, M. K. Song, C. H. Yun, and S. H. Han, "Intranasal immunization with protective antigen of *Bacillus anthracis* induces a long-term immunological memory response," *Mol. Immunol.*, vol. 67, no. 2, pp. 492–500, 2015.
- [109] Y. Wang, B. Jiang, Y. Guo, W. Li, Y. Tian, G. F. Sonnenberg, J. N. Weiser, X. Ni, and H. Shen, "Cross Protective Mucosal Immunity Mediated by Memory Th17 Cells against *Streptococcus pneumoniae* Lung Infection," *Mucosal Immunol.*, vol. 10, no. 1, pp. 250–259, 2017.
- [110] Y. Lu, J. Gross, D. Bogaert, A. Finn, L. Bagraade, Q. Zhang, K. Jay, A. Srivastava, A. Lundgren, S. Forte, C. M. Thompson, K. F. Harney, P. W. Anderson, M. Lipsitch, and R. Malley, "Interleukin-17A Mediates Acquired Immunity to Pneumococcal Colonization," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 9, 2008.
- [111] S. Sakaguchi, "The origin of FOXP3-expressing CD4 + regulatory T cells: thymus or periphery," *J. Clin. Invest.*, vol. 112, no. 9, pp. 1310–1312, 2003.
- [112] K. Chen and J. K. Kolls, "T Cell–Mediated Host Immune Defenses in the Lung Kong," *Ann. Rev. Immunol.*, vol. 31, pp. 605–633, 2013.
- [113] N. Muñoz-Wolf, A. Rial, J. M. Saavedra, and J. A. Chabalgoity, "Sublingual Immunotherapy as an Alternative to Induce Protection Against Acute Respiratory Infections," *J. Vis. Exp.*, vol. 90, pp. 1–10, 2014.
- [114] M. J. Tuvim, B. E. Gilbert, B. F. Dickey, and S. E. Evans, "Synergistic TLR2/6 and TLR9 activation protects mice against lethal influenza pneumonia.," *PLoS One*, vol. 7, no. 1, p. e30596, 2012.
- [115] M. Alyanakian, A. Aumeunier, C. Chiavaroli, C. Gouarin, E. Bardel, L. Chatenoud, and N. Thieblemont, "Transforming Growth Factor- β and Natural Killer T-Cells Are Involved in the Protective Effect of a Bacterial Extract on Type 1 Diabetes," *Diabetes*, vol. 55, pp. 179–185, 2006.
- [116] M. Huber, M. Ayoub, S. D. C. Pfannes, K. Mittenbuhler, K. Weis, W. G. Bessler, and W. Baier, "Immunostimulatory activity of the bacterial extract OM-89," *Eur. J. Med. Res.*, vol. 5, pp. 101–109, 2000.
- [117] K. M. Rigby and F. R. DeLeo, "Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections," *Semin. Immunopathol.*, vol. 34, no. 2, pp. 237–259, 2012.
- [118] R. D. Pechous, "With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. May, 2017.

- [119] A. Craig, J. Mai, S. Cai, and S. Jeyaseelan, "Neutrophil Recruitment to the Lungs during Bacterial Pneumonia," *Infect. Immun.*, vol. 77, no. 2, pp. 568–575, 2009.
- [120] J. O. Cleaver, D. You, D. R. Michaud, F. A. G. aacute n Pruneda, M. M. L. Juarez, J. Zhang, P. M. Weill, R. Adachi, L. Gong, S. J. Moghaddam, M. E. Poynter, M. J. Tuvim, and S. E. Evans, "Lung epithelial cells are essential effectors of inducible resistance to pneumonia," *Mucosal Immunol.*, vol. 7, no. 1, pp. 78–88, 2013.
- [121] J. A. Whitsett and T. Alenghat, "Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity.," *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 27–35, 2015.
- [122] K. L. Brown, C. Cosseau, J. L. Gardy, and R. E. W. Hancock, "Complexities of targeting innate immunity to treat infection," *Trends Immunol.*, vol. 28, no. 6, pp. 260–266, 2007.
- [123] H. M. Kling, G. J. Nau, T. M. Ross, T. G. Evans, K. Chakraborty, K. M. Empey, and J. A. L. Flynn, "Challenges and future in vaccines, drug development, and immunomodulatory therapy," *Ann. Am. Thorac. Soc.*, vol. 11, pp. S201–S210, 2014.
- [124] V. Y. Alfaro, D. L. Goldblatt, G. R. Valverde, M. F. Munsell, L. J. Quinton, A. K. Walker, R. Dantzer, A. Varadhachary, B. L. Scott, S. E. Evans, M. J. Tuvim, and B. F. Dickey, "Safety, tolerability, and biomarkers of the treatment of mice with aerosolized Toll-like receptor ligands," *Front. Pharmacol.*, vol. 5, pp. 1–13, 2014.

Premios y publicaciones

Premios asociados a la tesis

“Lisados bacterianos polivalentes como inmunoestimulantes para el tratamiento de infecciones respiratorias”

Florencia Ferrara, Analía Rial, Norma Suarez, José A. Chabalgoity

XI Encuentro Nacional de Microbiólogos, 15 y 16 de junio del 2015, Montevideo, Uruguay.

Mejor Poster en área Salud Humana y Animal

Publicación asociada a la tesis

N. Suarez, F. Ferrara, P. Macarena, A. Rial, and J. A. Chabalgoity, “Characterization of bacterial lysates by use of Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting,” *SOJ Biochem*, vol. 3, no. 1, pp. 1–7, 2017.

Manuscrito en preparación

“Intranasal administration of polyvalent lysate confers protection against lethal pneumonia and does not depend on neutrophil recruitment to the lungs”

F. Ferrara, A. Rial, N. Suarez, J.A. Chabalgoity

Anexo 1

Medio vegetal para *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*

Composición:

- Cloruro de sodio (NaCl) 2 g/L
- Fosfato de Sodio dibasico (Na_2HPO_4) 2 g/L
- Acetato de Sodio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$) 0.5 g/L
- Glucosa 6 g/L
- Soya Peptona Vegetal 40g/L

Se prepara, se autoclava y se conserva a 4 °C.

Medio vegetal para *Haemophilus influenzae*

Composición:

- Cloruro de Sodio 3 g/L
- Monohidrogenofosfato de sodio 2 g/L
- Acetato de Sodio 0.5 g/L
- Glucosa 6 g/L
- Soya Pentona vegetal 40 g/L
- Inosina 0.1 g/L
- Cloruro de Calcio 0.02 g/L
- Cloruro de potasio 0.1 g/L
- Bicarbonato de Sodio 0.6 g/L
- Piruvato de Sodio 0.06 g/L
- Solución metálica (Sulfato de cobre 3mg/L; cloruro de hierro 830mg/L; sulfato de zinc 860mg/L; ácido sulfúrico 1.1mg/L): 0.5 ml/L
- Hemina 25 mg/L
- NADH 25 mg/L

Se prepara, se autoclava y se conserva a 4 °C. Las soluciones de Hemina y NADH se agregan en el momento de utilización del medio.

Anexo 2

Primers murinos empelados en qPCR

Nombre	Secuencia 5`-3`
<i>Bactin-F</i>	GCTTCTTTGCAGCTCCTTCGT
<i>Bactin-R</i>	CGTCATCCATGGCGAACTG
<i>Ccl20-F</i>	TTTTGGGATGGAATTGGACAC
<i>Ccl20-R</i>	TGCAGGTGAAGCCTTCAACC
<i>Cxcl1-F</i>	CTTGTTTCAGAAAATTGTCCAAAA
<i>Cxcl1-R</i>	ACGGTGCCATCAGAGCAGTCT
<i>Il10-F</i>	CATTTGAATTCCTGGGTGAGA
<i>Il10-R</i>	TGCTCCACTGCCTTGCTCTT
<i>Il6-F</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGAAA
<i>Il6-R</i>	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
<i>Tnfa-F</i>	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA
<i>Tnfa-R</i>	CCTCCAATTGGTGGTTTGCT
<i>Il17a-F</i>	CTCCAGAAGGCCCTCAGACTAC
<i>Il17a-R</i>	GGGTCTTCATTGCGGTGG
<i>Ifng-F</i>	TCAGCAACAGCAAGGCGAAA
<i>Ifng-R</i>	CCGCTTCTGAGGCTGGAT
<i>S100a9-F</i>	CACCCTGAGCAAGAAGGAAT
<i>S100a9-R</i>	TGTCATTTATGAGGGCTTCATT
<i>Lcn2-F</i>	CCATCTATGAGCTACAAGAGAACAAT
<i>Lcn2-R</i>	TCTGATCCAGTAGCGACAGC
<i>Tgfb-F</i>	GCTGAACCAAGGAGACGGAAT
<i>Tgfb-R</i>	GAGTTTGTTATCTTTGCTGTACAAGA
<i>Foxp3-F</i>	CCCAGGAAAGACAGCAACCTT
<i>Foxp3-R</i>	TTCTACAACCAGGCCACTTG
<i>Il22-F</i>	TTTCTGACCAAACCTCAGCA
<i>Il22-R</i>	TCTGGATGTTCTGGTCGTCA

Primers humanos empelados en qPCR

Nombre	Secuencia 5`-3`
<i>Ccl20-F</i>	CAGTGCTGCTACTCCACCTC
<i>Ccl20-R</i>	GCAGTCAAAGTTGCTTGCTTCT
<i>Cxcl1-F</i>	CGCCCAAACCGAAGTCATAG
<i>Cxcl1-R</i>	TTGGATTTGTCAGTTCAGCAT
<i>Cxcl8-F</i>	GCGCCAACACAGAAATTATTGTAA
<i>Cxcl8-R</i>	GCCCTCTCAAAAACCTCTCCAC
<i>Il6-F</i>	GGTACATCCTCGACGGCATC
<i>Il6-R</i>	CTTGTTACATGTCTCCTTCTCAGG
<i>Tnfa-F</i>	ATCTTCTCGAACCCCGAGTG
<i>Tnfa-R</i>	CAGCTTGAGGGTTTGCTACAAC
<i>B2m-F</i>	GAGGCTATCCAGCGTACTCCA
<i>B2m-R</i>	TCGGATGGATGAAACCCAGAC
<i>Lcn2-F</i>	TTTTGTTCCAGGTTGCCAGC
<i>Lcn2-R</i>	CACCACTCGGACGAGGTAAC