

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



**BIOFILMES DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*:
GENÉTICA, COMPOSICIÓN Y TERAPIA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mirian Domenech Lucas

Bajo la dirección de los doctores

Miriam Moscoso Naya
Ernesto García López

Madrid, 2012

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



**Biofilm de *Streptococcus pneumoniae*:
genética, composición y terapia**

TESIS DOCTORAL

MIRIAN DOMENECH LUCAS

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

Madrid, 2012

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

**Biofilm de *Streptococcus pneumoniae*:
genética, composición y terapia**

Tesis doctoral presentada por
Mirian Domenech Lucas
para optar al Grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid

Directores:

Dra. Miriam Moscoso Naya

Dr. Ernesto García López

Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC

MADRID, 2012

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a la concesión de una beca incluida dentro del Programa de Becas Predoctorales de Formación de Investigadores del Ministerio de Ciencia e Innovación y al CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES).

En primer lugar agradecer la oportunidad de realizar la Tesis en este laboratorio al Prof. Ernesto García, al Dr. Pedro García y a la Dra. Miriam Moscoso, nunca olvidaré aquella entrevista y la buena sensación con la que salí de la misma. Todo aquello de lo que hablamos se ha visto realizado en estos años.

Mi más sincero agradecimiento a mis directores, Miriam Moscoso y Ernesto García, ambos me habéis enseñado y ayudado a formarme en este mundo de la ciencia. Siempre habéis estado disponibles incondicionalmente, dispuestos a escuchar cualquier cosa, ya fuese sobre ciencia o no, siempre me habéis dado prioridad. Me habéis protegido, pero sobre todo habéis dejado que sea yo. Muchas gracias Miriam por introducirme en el apasionante mundo de los biofilmes, por ser mi jefa, cuando lo has tenido que ser y por ser mi amiga a la vez. Ernesto, puff, gracias por ser como eres. Ojalá siga teniendo tanta suerte y me siga encontrando con jefes como vosotros. Necesito dejar bien claro que esta Tesis, es trabajo y esfuerzo de los tres, desde el primer segundo hasta el último y que esto se ha hecho realidad gracias a vosotros. Sólo puedo deciros GRACIAS, GRACIAS y GRACIAS.

Mi agradecimiento por todos los consejos dados por los Drs. Pedro García, Eduardo Díaz, Auxi Prieto, Teresa Zamarro, Manuel Carmona, José Luis García y, cómo no, a la persona que da nombre al laboratorio, el Dr. Rubens López. A mi directora de Tesina Belén Patiño por estar siempre y a la Dra. Covadonga Vázquez por darme la oportunidad de formar parte del Departamento de Microbiología III y poder iniciarme en el mundo de la Microbiología.

Eloísa, muchas gracias por cuidar de mí como una mami y facilitarme tanto el trabajo. Joselito, muchas gracias por todo, me has hecho reír y eso ha hecho que el día a día sea ameno, también agradecerte el apoyo científico que me has dado. Para el final de este apartado me he dejado a la mejor compañera del laboratorio que he podido tener, ha sido y es mi compañera de fatigas, siempre has estado a mi lado, pasando a ser mi amiga, mil gracias Elisa, no hace falta que escriba más, tú lo sabes.

A todos mis compañeros de poyata, pasillo y descanso: María, Rober, Andrés, Javier, Ana, Loreine, Ife, Vir, Bea, Tere, Julia, Carlos, Nina, Esther, Carmen, Zaira, Fernando, Begoña, Susana y a los que ya no están, Gonn, Iria, Valle, Laura, Susana C. y otros como Mónica, Jessi, Amaia, Petra y, por supuesto, a María del Mar y Belén. Me gustaría deciros algo uno por uno pero se haría muy largo y además me da vergüenza; Andrés y Lolito nunca dejéis de sonreír.

A mis amigos Mónica, M^a José, Sandra, Carmen, Luluta, Bonis, Sergio, Santi, Irene, Cinthia y, sobre todo, a mi Miluki, nuestra amistad siempre es incondicional, a mi Cone y a Fer, gracias por estar ahí y aguantarme.

Gracias al Dr. Roberto Kolter por brindarme la oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio y a la Dra. Hera Vlamakis por su comprensión y ayuda en el laboratorio. Mi agradecimiento al Dr. Diego Romero por tu dirección durante esos tres meses, por tus enseñanzas y por hacerme reír.

Al Dr. José Yuste y a la futura Dra. Elisa Ramos por prepararme los cultivos celulares y ayudarme con la citometría de flujo. A la Dra. Alicia Prieto por el análisis del exopolisacárido de la matriz. A la Dra. Maite Seisdedos por el apoyo técnico y los consejos dados en todo lo referente a microscopía láser confocal.

A Pablo, a mis padres y a mi hermana por apoyarme en todo lo que hago, por aguantarme y por quererme tal y como soy y por intentar comprender mi trabajo, GRACIAS a los cuatro. Soy lo que soy gracias a vosotros. Pablo no puedo resumir en palabras TODO lo que te agradezco y lo que significas para mí; tú eres TODO para mí. A mis abuelos, que os quiero. A Gemma y David, sois los que mejor entendéis lo que hago y por qué lo hago, gracias por vuestro apoyo. A mis sobrinas, Rocío, María y Carmen que ya se interesan por los bichitos del trabajo de la tía. A mi suegro que me mira con orgullo. A Irene por ser una buena prima. A mis cuñados, Sergio y Raúl. A Lola y Puri. Estoy muy agradecida por teneros siempre ahí y es imposible deciros todo lo que os quiero. ¡Muy pronto seremos uno más en esta pequeña gran familia!

Y ahora preparaos para un pedacito de ciencia...

A Pablo y Daniela

A mis padres y hermana

“Science can never solve one problem
without raising ten more problems”

George Bernard, 1930

ABREVIATURAS

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

ADC, arginina descarboxilasa.

ADN-e, ADN extracelular.

Amp, ampicilina.

AOM, otitis media aguda o *acute otitis media*.

ATCC, *American Type Culture Collection*.

AUH, agmatinasa.

BSA, seroalbúmina bovina.

BZA, benzamidina.

C+A, medio CpH8 suplementado con BSA al 0.08%.

C+Y, medio CpH8 suplementado con extracto de levadura al 0.08%.

C+Y+A, medio C+Y suplementado con BSA al 0.08%.

C4BP, proteína de unión al factor C4b del complemento.

cap3, operón capsular de neumococo de serotipo 3.

cap3p, promotor del operón capsular de serotipo 3.

CAZy, base de datos de enzimas con actividad sobre carbohidratos o *Carbohydrate Active enZymes*.

CaBM, dominio de unión a azúcares o *carbohydrate-binding module*.

CANSDC, carboxinoespermidina descarboxilasa.

CANSDH, carboxinoespermidina deshidrogenasa.

CASDC, carboxiespermidina descarboxilasa.

CASDH, carboxiespermidina deshidrogenasa.

CBD, dominio de unión a colina o *choline-binding domain*.

CBP, proteína de unión a colina o *choline-binding protein*.

CBR, repetición de unión a colina o *choline-binding repeat*.

CC, complejo clonal (conjunto de *secuencitipos* idénticos en, al menos, 6 de los 7 alelos MLST).

CCUG, *Culture Collection, University of Göteborg*.

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo.

CLSM, microscopio (y microscopía) de barrido láser confocal.

Cm, cloranfenicol.

ConA, concanavalina A.

cpm, cuentas por minuto.

CPS, polisacárido capsular.

CRP, proteína C-reactiva.

CSP, péptido estimulador de la competencia o *competence-stimulating peptide*.

CTM, medio completo de transformación.

CV, solución de cristal violeta al 1% en agua.

DAPI, 4', 6-diamidino-2-fenilindol.

DDAO, 7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridin-2-ona).

DO, densidad óptica.

Doc, desoxicolato sódico.

DispB, dispersina B.

DTT, ditioneitol.
EDTA, ácido etilendiaminotetraacético.
EPS, sustancias poliméricas extracelulares o *extracellular polymeric substances*.
Ery, eritromicina.
fi, factor I; un regulador del sistema del complemento.
fH, factor H; un regulador del sistema del complemento.
FITC, isotiocianato de fluoresceína.
GalNAc, *N*-acetil-D-galactosamina.
GFP, proteína con fluorescencia verde o *green fluorescent protein*.
GH, glicósido hidrolasa.
GlcNAc, *N*-acetilglucosamina.
GT, glicosiltransferasa.
HEWL, lisozima de clara de huevo.
IPD, enfermedad neumocócica invasiva o *invasive pneumococcal disease*.
IPTG, isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
IRs, repeticiones invertidas.
Kan, kanamicina.
Ln, lincomicina.
LTA, ácido lipoteicoico.
LTSEM, microscopio (y microscopía) de barrido a bajas temperaturas.
MAC, complejo de ataque a la membrana o *membrane attack complex*.
MASP, serín proteasas asociadas a MBL o *mannose-binding lectin-associated serine proteases*.
MBL, lectina de unión a manosa o *mannose-binding lectin*. También reciben el nombre conjunto de co-lectinas.
MIC, Concentración mínima inhibitoria.
MLSA, análisis mediante secuenciación multilocus o *multilocus sequence analysis*.
MLST, tipificación mediante secuenciación multilocus o *multilocus sequence typing*.
MLEE, electroforesis enzimática multilocus o *multilocus enzyme electrophoresis*.
MurNAc, ácido *N*-acetilmurámico.
NAC, *N*-acetil-L-cisteína.
NAM-amidasa, *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa.
NCTC, *National Collection of Type Cultures* (<http://www.hpacultures.org.uk/collections/nctc.jsp>).
NeuNAc, ácido *N*-acetilneuramínico.
Opt, optoquina.
PAF, factor de activación plaquetaria o *platelet-activating factor*.
PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb, pares de bases.
PCV7, vacuna conjugada antineumocócica heptavalente.
Pen, penicilina.
PFGE, electroforesis en campo pulsado o *pulsed-field gel electrophoresis*.
PL, polisacárido liasa.
pIgR, receptor de las inmunoglobulinas poliméricas o *polymeric immunoglobulin receptor*.
PMSF, fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
PNA, aglutinina del cacahuete o *peanut agglutinin*.
^R, resistente.
RA, región accesoria del genoma de neumococo, es decir, no presente en todas las cepas.
^S, susceptible o sensible.
SBA, aglutinina de soja.

SDS, dodecilsulfato sódico.
SGM, estreptococo(s) del grupo mitis.
slgA, IgA secretora.
SLV, mutante de un clon que difiere del resto de los miembros del mismo en sólo un alelo de los siete MLST (*single locus variant*).
Spc, espectinomicina.
SpdSyn, espermidina sintasa.
ST, secuencitipo o *sequence type*.
Str, estreptomycin.
^T, cepa tipo.
TA, ácido teicoico.
Tampón SP, tampón fosfato sódico 20 mM (ajustado a pH 6.9, salvo indicación en contra).
Tampón TC, tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0.
Tampón TE, tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM.
Tc, tetraciclina.
Tris, tris(hidroximetil)aminometano.
TSB, caldo de tripticaseína y soja.
TSBGY, TSB suplementado con glucosa (0.4%) y extracto de levadura (0.3%).
U, unidad(es) de actividad enzimática.
UFC, unidades formadoras de colonias.
Van, vancomicina.
VanNT, no tolerante a Van.
VanT, tolerante a Van.
WGA, aglutinina de germen de trigo.
X-Gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. CARACTERÍSTICAS DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>	3
1.1. Aspectos históricos	3
1.2. Características generales	4
1.3. Importancia clínica de <i>S. pneumoniae</i>	5
1.4. Tipificación y genes capsulares	7
1.5. Características de las proteínas de unión a colina o CBPs	11
2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA	15
2.1. Adhesión/colonización	15
2.2. Invasión	20
2.3. Inflamación y shock	22
2.4. El sistema del complemento	23
2.4.1. Activación del componente C3b y formación del MAC	25
2.4.2. Regulación	26
3. CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOFILMES DE <i>S. PNEUMONIAE</i>	29
3.1. Características de los biofilmes microbianos	29
3.1.1. Formación de un biofilm	30
3.1.2. Regulación del proceso de formación de un biofilm	31
3.2. Biofilmes de <i>S. pneumoniae</i>	33
3.2.1. Factores ambientales que afectan a la formación de biofilm	34
3.2.2. Estructura del biofilm neumocócico	35
3.2.3. Matriz extracelular del biofilm neumocócico	36
3.2.4. Patrones de expresión génica y producción proteica	38
3.2.5. Terapia contra los biofilmes de <i>S. pneumoniae</i>	39
II. OBJETIVOS	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS	47
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	53
3. REACTIVOS Y OTROS PRODUCTOS	54
4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA	58
4.1. Obtención de cepas capsuladas de <i>S. pneumoniae</i>	58
5. TÉCNICAS DE ADN	59
5.1. Preparación de ADN cromosómico	59
5.2. Preparaciones de ADN plasmídico	60
5.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	60
5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	61
5.5. Secuenciación de ADN	61
5.6. Manipulación del ADN con enzimas de uso común en biología	

<i>molecular</i>	61
5.7. Mutagénesis mariner	62
5.7.1. Purificación de la trasposasa Himar1	62
5.7.2. Mutagénesis	62
5.8. Construcción de mutantes de inserción por recombinación homóloga	64
6. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS	64
6.1. Expresión y purificación de enzimas líticas	64
6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS	66
7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	66
7.1. Aislamiento y purificación de paredes radiactivas	66
7.2. Ensayo de actividad enzimática	67
8. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR DE SEROTIPO 3	67
9. BIOFILMES	68
9.1. Formación de biofilmes en placas multipocillo	68
9.1.1. Ensayos de inhibición y disgregación del biofilm	69
9.2. Microscopía láser confocal	69
9.3. Microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas	70
9.4. Extracción, purificación y análisis del polisacárido extracelular de la matriz del biofilm	70
9.4.1. Determinación de la composición de monosacáridos del exopolisacárido	71
9.4.2. Determinación de la estructura de los carbohidratos del exopolisacárido de la matriz del biofilm	72
10. ENSAYOS DE DEPOSICIÓN DE MOLÉCULAS DEL COMPLEMENTO Y OPSONOFAGOCITOSIS	73
10.1. Ensayos de deposición del complemento	73
10.2. Opsonofagocitosis	74
11. MISCELÁNEA	74
IV. RESULTADOS	75
1. BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DE BIOFILM DE <i>S. PNEUMONIAE</i> ...	77
1.1. Mutagénesis mariner	77
1.1.1. Genoteca de <i>S. pneumoniae</i> R6	77
1.1.2. Genoteca de <i>S. pneumoniae</i> M32	80
1.1.3. Papel biológico de los genes implicados en la síntesis de biofilm	80
1.2. Otros genes	90
2. PAPEL DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR EN LOS BIOFILMES DE <i>S. PNEUMONIAE</i>	94
2.1. Biofilm de cepas de los serotipos 1 y 3	95
2.1.1. Aislamiento de mutantes espontáneos no capsulados de neumococo serotipo 3 asociados a la formación de biofilm	96
2.1.2. Localización de las mutaciones y clasificación de los mutantes	101
2.1.3. Formación de biofilmes por los mutantes no capsulados	101
2.1.4. Cuantificación del polisacárido capsular de los mutantes no capsulados	

de neumococo serotipo 3	102
2.1.5. Cultivos mixtos de cepas con y sin cápsula y formación de biofilm	103
2.1.6. Caracterización funcional de los mutantes en el promotor del operón capsular de neumococo serotipo 3 (cap3p)	105
2.2. Formación de biofilmes por neumococos del serogrupo 19	107
3. LA MATRIZ EXTRACELULAR DE LOS BIOFILMES DE S. PNEUMONIAE	112
3.1. Componentes de la matriz	112
3.1.1. Ácidos nucleicos	112
3.1.2. Proteínas de la matriz	115
3.1.3. Complejos ADN-proteína	116
3.1.4. Exopolisacáridos	123
3.2. Búsqueda de genes implicados en la síntesis o degradación del exopolisacárido de la matriz del biofilm	133
3.2.1. Búsqueda de genes implicados en la síntesis de EPS	133
3.2.2. Degradación del EPS	138
3.3. Extracción del exopolisacárido y análisis de carbohidratos	142
4. BIOFILMES DE S. PNEUMONIAE Y SISTEMA INMUNE DEL HOSPEDADOR	146
4.1. Evasión del sistema del complemento por parte de los biofilmes neumocócicos	146
4.1.1. Depósito de C3b	147
4.1.2. Evasión de la vía clásica	150
4.1.3. Reclutamiento de reguladores	152
4.2. Opsonofagocitosis	154
5. TERAPIA CONTRA LOS BIOFILMES DE S. PNEUMONIAE Y OTRAS BACTERIAS	156
5.1. Estudio de la adición de xilitol al biofilm de S. pneumoniae	156
5.2. Efecto de la N-acetil-L-cisteína en los biofilmes	157
5.3. Uso de enzimas líticas de neumococo y sus fagos contra los biofilmes de S. pneumoniae y otros SGM	158
V. DISCUSIÓN	165
1. APROXIMACIÓN A LAS BASES GENÉTICAS DE LA FORMACIÓN DEL BIOFILM DE S. PNEUMONIAE	167
2. PROS Y CONTRAS DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR EN LA FORMACIÓN DEL BIOFILM	175
3. LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL BIOFILM NEUMOCÓCICO	180
4. LOS BIOFILMES DE S. PNEUMONIAE ELUDEN EL SISTEMA INMUNE	189
5. NUEVAS ESTRATEGIAS ANTI-BIOFILMES NEUMOCÓCICOS	192
VI. CONCLUSIONES	197
VII. BIBLIOGRAFÍA	201

I. INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

1.1. Aspectos históricos

S *treptococcus pneumoniae* (neumococo) fue descubierto por primera vez por Sternberg en 1880 mediante la inoculación de conejos con su propia saliva. En diciembre de ese mismo año y de manera independiente, Pasteur aisló la bacteria de ratones a los que había inyectado la saliva de un niño muerto por el virus de la rabia. Las observaciones de Pasteur se hicieron públicas antes que las de Sternberg en una reunión de la Academia Francesa de Medicina en París en enero de 1881 (Pasteur, 1881) mientras que las de Sternberg se publicaron en abril de ese mismo año (Sternberg, 1881). En 1884, Gram desarrolló la tinción que lleva su nombre no tanto para diferenciar bacterias sino para facilitar la visualización de neumococo en el tejido pulmonar (Gram, 1884). Ese mismo año, este microorganismo fue denominado *Micrococcus pneumoniae* (Klein, 1884), más tarde *Diplococcus pneumoniae* (Weichselbaum, 1886) y, finalmente, *S. pneumoniae* (Chester, 1901). No obstante, debe hacerse notar que esta última denominación no fue aceptada oficialmente hasta 1980 (Skerman *et al.*, 1980).

Neumococo ha desempeñado un papel fundamental en el nacimiento de la biología molecular. En 1928, el científico británico Griffith obtuvo la primera evidencia de transformación genética bacteriana trabajando con *S. pneumoniae*. Griffith estaba realizando estudios sobre la cápsula de neumococo y demostró que, si células capsuladas muertas por calor se inyectaban en un ratón junto a células no capsuladas vivas (que carecían de virulencia por sí solas), se producía una infección mortal y las bacterias que se recuperaban del animal eran de tipo capsulado (Griffith, 1928). A la sustancia responsable de este cambio se le denominó “principio transformante”. Este principio fue identificado a nivel molecular por Oswald T. Avery y sus colaboradores del Instituto Rockefeller de Nueva York, en una serie de estudios llevados a cabo en los años 30 y que culminaron en 1944 con la demostración de que los genes están hechos de ADN (Avery *et al.*, 1944; McCarty y Avery, 1946). Entre las muy numerosas revisiones que recogen experiencias históricas sobre la investigación con neumococo podemos recomendar algunas al lector interesado (Hayes, 1966; Downie, 1972; White *et al.*, 1979; Austrian, 1981, 1993, 2000; Watson *et al.*, 1993; Watson y Musher, 1994; Lederberg, 1994; McCarty, 1994; Reichard, 2002; López, 2006).

1.2. Características generales

Neumococo es una bacteria Gram-positiva, de 0.5–1.25 μm de longitud que, frecuentemente, forma parte de la microbiota del tracto respiratorio superior del ser humano. De manera excepcional, se han aislado neumococos a partir de animales de compañía así como de otros animales que habían estado previamente en contacto con humanos (van der Linden *et al.*, 2009). En particular, *S. pneumoniae* de serotipo 3 es causa frecuente de enfermedad respiratoria en caballos de carreras (Benson y Sweeney, 1984; Chanter, 1994; Wood *et al.*, 2005). No obstante, aparte del ser humano, neumococo parece ser causa de enfermedad respiratoria potencialmente mortal en chimpancés salvajes (Chi *et al.*, 2007). Una información más amplia a este respecto puede obtenerse en <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ss/pneumoniae.html>.

S. pneumoniae se encuentra, generalmente, formando cadenas cortas o en parejas (diplococos). Cuando se cultiva en placas de agar-sangre en aerobiosis presenta una marcada α -hemólisis debido a la producción de peróxido de hidrógeno (Barnard y Stinson, 1996) pero, si es incubado en anaerobiosis, se observa β -hemólisis debida a la acción de la neumolisina (Ply) (Brzin, 1969). Neumococo es una bacteria ácido-láctica, anaerobia facultativa, catalasa-negativa y sensible a las sales biliares como el desoxicolato sódico (Doc); este detergente dispara la acción incontrolada de la principal autolisina (LytA) (una *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa; NAM-amidasa; EC 3.5.1.28) que degrada la pared celular en un proceso absolutamente dependiente de colina (Mosser y Tomasz, 1970). La colina es un requerimiento imprescindible para el crecimiento de este microorganismo (Tomasz, 1967) y es un componente estructural de los ácidos teicoicos (TAs) de la pared celular y de los lipoteicoicos (LTAs) unidos a la membrana (Brundish y Baddiley, 1968; Fischer *et al.*, 1993; Fischer, 2000; Seo *et al.*, 2008). Además de la lisis en presencia de Doc, la sensibilidad a la optoquina (Opt) es otra prueba diagnóstica universalmente utilizada para la identificación de aislados de neumococo en el laboratorio clínico (Lund y Henrichsen, 1978). La optoquina, un derivado de la quinina, es un inhibidor específico de algunas de las proteínas que forman parte de la subunidad F_0 de la ATPasa protón-motriz (H^+ -ATPasa) de neumococo (Fenoll *et al.*, 1994). Hay que hacer notar, sin embargo, que existen cepas de neumococo Opt-resistentes (Opt^R) así como estreptococos filogenéticamente muy próximos a neumococo —los denominados estreptococos del grupo mitis o SGM— que pueden ser susceptibles a la

acción de la Opt (Opt^S) (de la Campa *et al.*, 1997; Martín-Galiano *et al.*, 2003; Balsalobre *et al.*, 2006). En consecuencia, esta técnica debe ser utilizada conjuntamente con la de la lisis en presencia de Doc para poder llevar a cabo un diagnóstico correcto. En la actualidad, existen 13 especies de SGM (Martín *et al.*, 2011) pero las más próximas filogenéticamente a neumococo son, por este orden, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus infantis* (Kilian *et al.*, 2008; Donati *et al.*, 2010).

Sobre la base de la secuencia nucleotídica de 44 cepas, el genoma de neumococo tiene una longitud media de 2.1 millones de pares de bases (Mpb), variando entre 1.989 Mpb para la cepa Sp02_1198 (Núm. Acceso CACH01000000) y 2.293 Mpb para la CDC3059-06 (Núm. Acceso ABGG00000000); posee un contenido en G+C del orden del 40% y, aproximadamente, sólo el 75% del genoma (1.5 Mpb) es común a todos los aislados (Donati *et al.*, 2010).

1.3. Importancia clínica de *S. pneumoniae*

La importancia de *S. pneumoniae* reside en su gran capacidad para causar enfermedad en el ser humano. Como ya se ha mencionado, el hábitat natural de esta bacteria es el tracto respiratorio superior humano. La bacteria es normalmente portada de manera asintomática en la nasofaringe de niños sanos (20–40%) y, menos frecuentemente, de adultos sanos (5–10%) y la colonización comienza poco después del nacimiento (estado de portador) (Austrian, 1986). Las enfermedades respiratorias son responsables anualmente de la muerte de 4 millones de personas en todo el mundo y *S. pneumoniae* es la especie predominante en estas infecciones (Morens *et al.*, 2004). Históricamente, la neumonía fue la principal causa de muerte entre la población infantil en los países industrializados y se estima que, en Estados Unidos en 1990, la neumonía mató a 47 de cada 1000 niños menores de 5 años. Aunque la situación en estos países cambió a lo largo del siglo XX, en Asia y África, la neumonía continúa siendo la principal causa de mortalidad infantil. Así, en los países en vías de desarrollo, la cuarta parte de los niños tienen un episodio de neumonía anualmente durante los primeros 5 años de vida (Scott *et al.*, 2008). En promedio y anualmente, entre el 2% y el 3% de los niños sufren una neumonía lo suficientemente grave para requerir hospitalización y muchos de estos episodios son potencialmente fatales. En los países industrializados, la enfermedad neumocócica invasiva (IPD) —aquella que se desarrolla cuando neumococo pasa de la

zona donde reside habitualmente a un área normalmente estéril (sangre, líquido cefalorraquídeo, etc.)— tiene lugar fundamentalmente en niños menores de dos años, en las personas de más de 65 y en los pacientes inmunodeprimidos. En los países en vías de desarrollo, la IPD es muy frecuente en niños menores de 2 años, incluyendo los recién nacidos; las tasas de enfermedad en adultos son prácticamente desconocidas. Se ha estimado que en la población de entre 1 y 59 meses de edad, se producen casi 15 millones de casos de IPD (93% de neumonías) que ocasionan entre 700 000 y 1 millón de fallecimientos anualmente en todo el mundo (WHO, 2007, 2009; O'Brien *et al.*, 2009).

Aunque en los años 40 del pasado siglo ya se habían descrito mutantes de neumococo resistentes a penicilina (Pen^R) obtenidos tanto *in vitro* (Rake *et al.*, 1944; Eriksen, 1945) como en animales de experimentación (Schmidt y Sesler, 1943), no fue hasta la década de los 60 cuando se observaron los primeros casos en humanos. Los primeros aislados clínicos de *S. pneumoniae* Pen^R fueron reportados en Estados Unidos (Kislak *et al.*, 1965) y Australia en los años 60 (Hansman y Bullen, 1967) mientras que los primeros neumococos multirresistentes y con una alta resistencia a Pen (Concentración Mínima Inhibitoria, MIC ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$) fueron descubiertos en Sudáfrica una década después (Jacobs *et al.*, 1978). A pesar de que la primera cepa Pen^R fue aislada en un adulto, la primera cepa multirresistente lo fue de un niño, posiblemente porque hoy en día se sabe que las cepas resistentes son más comunes en niños que en adultos. La razón de esta asociación no está muy clara pero parece reflejar el uso excesivo de antibióticos en la población infantil. El hecho de que los niños sean portadores habituales de neumococo conlleva a que su nasofaringe se constituya en un hábitat idóneo para que tengan lugar fenómenos de transmisión genética entre cepas sensibles y resistentes, aprovechando para ello la capacidad natural de neumococo para incorporar ADN exógeno, lo que conduce a la diseminación de la resistencia (McGee *et al.*, 2000). En la actualidad, hay cepas de *S. pneumoniae* Pen^R o multirresistentes distribuidas por todo el mundo. La estrategia de esta bacteria es favorecer la dispersión de un número limitado de clones; diez de tales clones son los responsables del 85% de las enfermedades neumocócicas Pen^R (Corso *et al.*, 1998). Los casos de cepas Pen^R pueden ser tratados eficazmente con quinolonas o macrólidos aunque también se han descrito situaciones de resistencia frente a antibióticos de estas familias (Balsalobre *et al.*, 2003; Low, 2005). La vancomicina (Van) es el antibiótico utilizado como último recurso para casos de cepas multirresistentes pero ya se han documentado casos en los que se ha

observado tolerancia a este fármaco (para una revisión reciente, véase Moscoso *et al.*, 2011).

El primer aislado clínico Pen^R en España fue identificado en 1979 (Casal, 1982) y, desde entonces, la cifra de cepas resistentes ha ido aumentando progresivamente. En los años 80 del siglo pasado tuvo lugar un aumento gradual en la resistencia de *S. pneumoniae* frente a Pen y otros antibióticos. En los 90, la prevalencia de los neumococos Pen^R permaneció estable situándose, aproximadamente, en el 40% de las cepas aisladas de adultos con enfermedad invasiva pero, en los aislados pediátricos tanto invasivos como no invasivos, aumentó hasta valores de entre el 50% y 60% (Liñares *et al.*, 2000). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo entre los años 2001 y 2003, se ha detectado un descenso en el número de cepas Pen^R en la población infantil, en coincidencia con un descenso en el consumo de antibióticos y con la introducción en 2001 de la vacuna conjugada heptavalente (PCV7) (Oteo *et al.*, 2004). También se han detectado cepas de *S. pneumoniae* con resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B y, lo que es más preocupante, resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Asimismo, se han encontrado cepas que presentan resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos (30–40%) lo que complica enormemente el tratamiento de las infecciones por neumococo. La mayoría de estos aislados pertenecen a los serogrupos/serotipos 6, 14, 15, 19, y 23 (Liñares *et al.*, 2000). Recientemente, se ha llegado a señalar que, debido a los niveles de resistencia frente a los antibióticos que han alcanzado ciertas bacterias Gram-positivas entre las que se incluye *S. pneumoniae*, estas variantes clínicas han alcanzado clínicamente el estatus de “supergérmes” (Hancock, 2005).

1.4. Tipificación y genes capsulares

Hasta 1998 en que se propuso la tipificación mediante secuenciación multilocus o MLST (Enright y Spratt, 1998) (ver más adelante), la técnica más utilizada de tipificación de neumococos era la serotipificación mediante la reacción capsular (también llamada de *Quellung*) (Neufeld, 1902), utilizando anticuerpos contra el polisacárido capsular (CPS) obtenidos en conejos mediante inoculación de células muertas con formaldehído (Mørch, 1942). Con la excepción de algunos brotes de conjuntivitis que pueden ser producidos por ciertos aislados de neumococo no capsulados (Martin *et al.*, 2003; Hathaway *et al.*, 2004; Berrón *et al.*, 2005; Hanage *et al.*, 2006b; Marsh *et al.*, 2010), la cápsula es el principal factor de virulencia de neumococo.

coco constituyendo una condición *sine qua non* para la misma y actúa bloqueando el reconocimiento del microorganismo por parte del hospedador impidiendo así la fagocitosis (Llull *et al.*, 2001b; Yother, 2004). Es la estructura más externa (Fig. 1) y está formada por polisacáridos complejos que están compuestos por unidades repetidas de azúcares (Kamerling, 2000) unidas a la pared celular, en la mayoría de los casos, posiblemente mediante enlaces covalentes (Sørensen y Blom, 1992). En la actualidad, se han descrito 93 serotipos capsulares inmunológicamente diferentes, 90 de los cuales fueron descritos hasta 1995 (Henrichsen, 1995) y tres más han sido encontrados en los últimos años, concretamente los serotipos 6C (Park *et al.*, 2007a, b), 6D (Bratcher *et al.*, 2009, 2010) y 11E (Zartler *et al.*, 2009; Calix y Nahm, 2010). Los 93 serotipos capsulares actuales se agrupan en 46 serogrupos numerados del 1 al 48 (los números 26 y 30 no se utilizan). Algunos serogrupos como el 1, 2 y 3 incluyen un único serotipo mientras que otros, como el serogrupo 11, pueden contener hasta 6. Normalmente, el primer serotipo descrito en un serogrupo con varios serotipos se identifica con la letra F (por *first*) (Lund, 1970) y los siguientes con las letras A, B, etc. Existen, no obstante, dos excepciones: el serogrupo 6 incluye los serotipos 6A, 6B, 6C y 6D y, en el serogrupo 9, las letras de los tres primeros serotipos descritos (Vammen, 1939) tienen relación con personajes históricos (L por Lederle, N por Neufeld y V por Valdemar, un príncipe danés muerto en 1938 de una neumonía bacteriémica y del que se aisló el primer neumococo de este serotipo) (Henrichsen, 1995).

El *cluster cap* (o *cps*) de neumococo (Fig. 2), que parece estar organizado como una unidad transcripcional (Moscoso y García, 2009), está situado entre *dexB* y *aliA* (dos genes que no participan en la biosíntesis de CPS) (Bentley *et al.*, 2006), con la única excepción del serotipo 37, en el cual, la síntesis de CPS depende de una única proteína codificada por un gen (*tts*) situado lejos del *locus cap* en el cromosoma de *S. pneumoniae* (Llull *et al.*, 1999, 2001a). Noventa y uno de los 93 CPS de neumococo se sintetizan por un mecanismo dependiente de una polimerasa (Wzy), por el cual, las subunidades repetidas se unen individualmente a undecaprenil fosfato en la cara interna de la membrana. Por el contrario, la síntesis de los CPS de los serotipos 3 y 37 está catalizada por una glicosiltransferasa (sintasa) unida a la membrana (Arrecubieta *et al.*, 1996b; Llull *et al.*, 2001a). En estos dos serotipos, las secuencias comunes situadas en el extremo 5' de todos los otros *loci* y que codifican proteínas con función reguladora, o no están presentes (serotipo 37) (Llull *et al.*,

2001a), o están inactivadas por mutación y no se transcriben (serotipo 3) (Arrecubieta *et al.*, 1995) (Fig. 2).

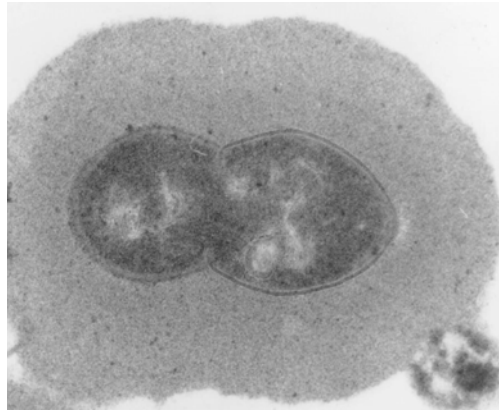


Figura 1. Imagen al microscopio electrónico de transmisión de un corte ultrafino de una cepa capsulada de serotipo 3 de neumococo mostrando la cápsula polisacáridica que rodea a la célula. Reproducido de Kim *et al.* (1999), con permiso.

Una de las características más notables del *locus cap* es su enorme divergencia genética, puesto que sólo unos pocos genes se encuentran conservados entre los diferentes *clusters* (Aanensen *et al.*, 2007). Como acabamos de mencionar, estos genes (*capA–D*) están implicados en el procesamiento, regulación y transporte del CPS y, posiblemente, en la unión del CPS a la pared celular (Kadioglu *et al.*, 2008). Sorprendentemente, sólo el primer gen del *cluster* (*cap/cpsA*) posee una similitud de más del 90% en todos los *loci* capsulares. En posición 5' del gen *capA*, se han identificado una secuencia promotora funcional (5'-TAGACA-17 nucleótidos-TATAAT-3') y el sitio de inicio de la transcripción (Muñoz *et al.*, 1997).

La determinación de las resistencias antimicrobianas y la electroforesis de ADN genómico en campo pulsado (PFGE) (Gasc *et al.*, 1991; Lefevre *et al.*, 1993) también se utilizan hoy en día como instrumentos para la tipificación de neumococo.

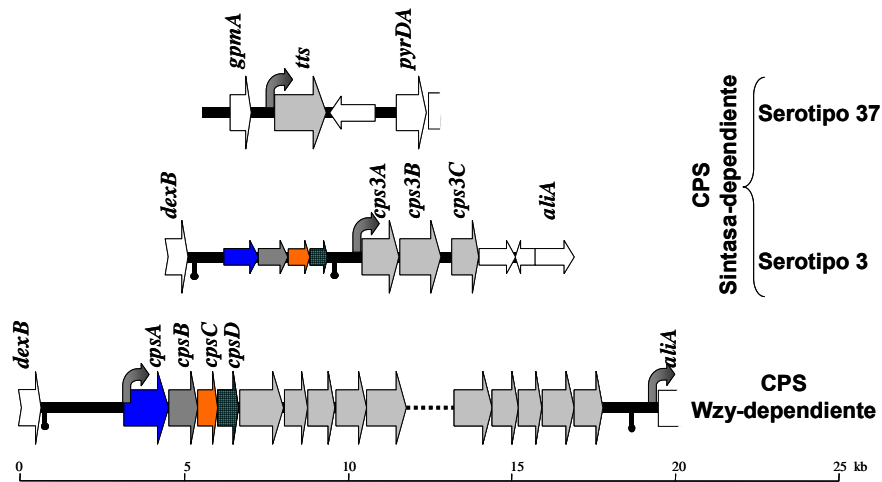


Figura 2. Organización de los *loci* capsulares de neumococo y sus regiones circundantes. Los genes serotipo-específicos están sombreados en gris mientras que los genes no relacionados con la síntesis de CPS están indicados como flechas blancas. Las flechas anchas y estrechas representan, respectivamente, genes y pseudogenes. Aparte de los genes serotipo-específicos, aquellas regiones del genoma que poseen una semejanza en nucleótidos superior al 90% se representan con color y sombreado idénticos. Las flechas curvadas indican las regiones promotoras. También se indican los posibles terminadores de transcripción (⏏). Reproducido de Moscoso y García (2009), con permiso.

Además de ellos, la técnica de MLST se basa en los mismos principios que la electroforesis enzimática multilocus (MLEE) (Selander *et al.*, 1986; Hall *et al.*, 1996) pero se diferencia de ésta esencialmente en que lo que se comparan son las secuencias parciales de siete genes muy conservados (*housekeeping*) que definen el denominado *secuencitipo* (ST), en lugar de la movilidad electroforética de sus productos respectivos. Esto hace que la comparación entre los resultados obtenidos en diferentes laboratorios sea muy sencilla y, para ello, se ha creado una base de datos en Internet (<http://spneumoniae.mlst.net/>) (Enright y Spratt, 1999). Recientemente, se ha descrito una variante de MLST conocida como análisis mediante secuenciación multilocus (MLSA) (Hanage *et al.*, 2006a) que utiliza genes diferentes a los del esquema MLST y que, fundamentalmente, está concebida para identificar especies de estreptococos α -hemolíticos (*viridans*) estrechamente relacionadas con *S.*

pneumoniae y que son difíciles de diferenciar por otros métodos (Bishop *et al.*, 2009) (<http://www.emlsa.net/>). Con respecto a la técnica MLST, señalaremos que los alelos secuenciados a partir de una parte de los genes *aroE* (siquimato deshidrogenasa), *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), *gki* (glucoquinasa), *recP* (transcetolasa), *spi* (peptidasa señal I), *xpt* (xantina fosforribosiltransferasa) y *ddl* (D-alanina-D-alanina ligasa) reciben un número al ser introducidos en la base de datos y el conjunto de dichos números se denomina *secuencitipo* (ST, *sequence type*). Un total de 6938 STs se encuentran incluidos en la base de datos (último acceso, 28 de agosto de 2011). Todos los aislados de neumococos que poseen el mismo ST se dice que constituyen un clon. Inicialmente, los diferentes miembros del clon son, evidentemente, indistinguibles por MLST pero, con el tiempo, dicho clon puede diversificarse dando lugar a variantes que difieran en uno de los siete *loci* (SLV, *single locus variants*) o más. El conjunto de ST idénticos y los que difieren entre sí con al menos un miembro del grupo en sólo uno de los siete genes recibe el nombre de complejo clonal (CC, *clonal complex*) (Aanensen y Spratt, 2005).

1.5. Características de las proteínas de unión a colina o CBPs

Las CBPs son proteínas que reconocen específicamente, como sitio de anclaje, los residuos de colina presentes en los TAs y LTAs; ello determina su localización en la superficie celular, como ya se ha dicho anteriormente en esta Memoria. Esta familia de proteínas no es exclusiva de *S. pneumoniae* ya que también se encuentra en otras especies bacterianas que poseen residuos de colina en la pared como son otras especies de SGM y, en particular, *S. pseudopneumoniae* (Llull *et al.*, 2006a), *S. mitis* (Moscoso *et al.*, 2005; Kilian *et al.*, 2008; Campuzano *et al.*, 2009; Hakenbeck *et al.*, 2009; Denapaite *et al.*, 2010) y *S. oralis* (Ronda *et al.*, 1988, 1989; Horne y Tomasz, 1993; Reichmann *et al.*, 2011) (Fig. 3), así como otras bacterias más alejadas filogenéticamente de neumococo como *Clostridium beijerinckii* (García *et al.*, 1988b; Podvin *et al.*, 1988; Sanchez-Beato *et al.*, 1995; Sánchez-Beato y García, 1996; García *et al.*, 2000b), *Clostridium difficile* (Demarest *et al.*, 2005; Ho *et al.*, 2005) y *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Makino *et al.*, 1998, 2000; To y Nagai, 2007; da Silva *et al.*, 2008; Ogawa *et al.*, 2011).

El número de CBPs de *S. pneumoniae* depende de la cepa bacteriana pero parece variar entre, aproximadamente, 10 y 15 (Tettelin *et al.*, 2001; Hoskins *et al.*, 2001; Hakenbeck *et al.*, 2009; Frolet *et al.*, 2010). Con la notable excepción de

CbpF, cuya estructura tridimensional indica que está formada exclusivamente por repeticiones de motivos de unión a colina (con variantes) (Molina *et al.*, 2009), todas las CBPs tienen la característica común de ser proteínas modulares compuestas por, al menos, dos dominios diferentes, uno de reconocimiento de colina, denominado dominio de unión a colina (CBD) —que le permite a la proteína unirse de forma no covalente a los residuos de colina de la superficie bacteriana— y otro dominio funcional responsable de la actividad biológica de cada proteína, sea ésta enzimática o no (García *et al.*, 2000b; Swiatlo *et al.*, 2004; López y García, 2004; López *et al.*, 2004) (Fig. 3).

Los CBDs se caracterizan por poseer un número variable [pero siempre ≥ 4 (García *et al.*, 1994)], de repeticiones de unos 20 aminoácidos cada una, que se denominan CBRs (repeticiones de unión a colina) (PF01473) (Fig. 3). Cada CBR de LytA se pliega formando una estructura en horquilla β , dando lugar a una superhélice levógira con forma característica de solenoide que constituye el CBD (Fernández-Tornero *et al.*, 2001, 2002). Plegamientos muy similares, cuando no idénticos, han sido observados en las demás CBDs de neumococo cuya estructura cristalina ha sido resuelta, esto es, Pce (Hermoso *et al.*, 2005), CbpF (Molina *et al.*, 2009), Spr1274 (Zhang *et al.*, 2009) y LytC (Pérez-Dorado *et al.*, 2010).

Algunas CBPs, como LytA, LytB, LytC, Pce y CbpD, están implicadas en la hidrólisis de diferentes enlaces covalentes de la pared celular de *S. pneumoniae*. La NAM-amidasa LytA (García *et al.*, 1985b, 1986) y la lisozima LytC (García *et al.*, 1999a) son las dos autolisinas de neumococo; la segunda posee una temperatura óptima de 30°C, lo que sugiere que podría desempeñar un importante papel en las vías respiratorias superiores (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). LytB es una *N*-acetilglucosaminidasa implicada en la separación de las células hijas al final de la división celular (García *et al.*, 1999b; De las Rivas *et al.*, 2002), mientras que Pce es una fosforilcolín esterasa capaz de liberar, siquiera parcialmente, los residuos de fosforilcolina de la pared celular (Höltje y Tomasz, 1974; de las Rivas *et al.*, 2001; Vollmer y Tomasz, 2001). CbpD parece ser una peptidoglicán hidrolasa con actividad autolítica que actúa en la zona de división celular (Guiral *et al.*, 2005; Eldholm *et al.*, 2009, 2010). CbpD contiene un dominio CHAP (*cysteine, histidine-dependent amidohydrolase/peptidase*) (Fig. 3), lo que sugiere que podría tratarse de una NAM-amidasa o de una endopeptidasa (Llull *et al.*, 2006b).

Además de desempeñar papeles fisiológicos importantes en procesos tales como la separación de las células hijas o la autólisis espontánea tanto en la fase estacionaria como la producida por los antibióticos β -lactámicos (López y García, 2004),

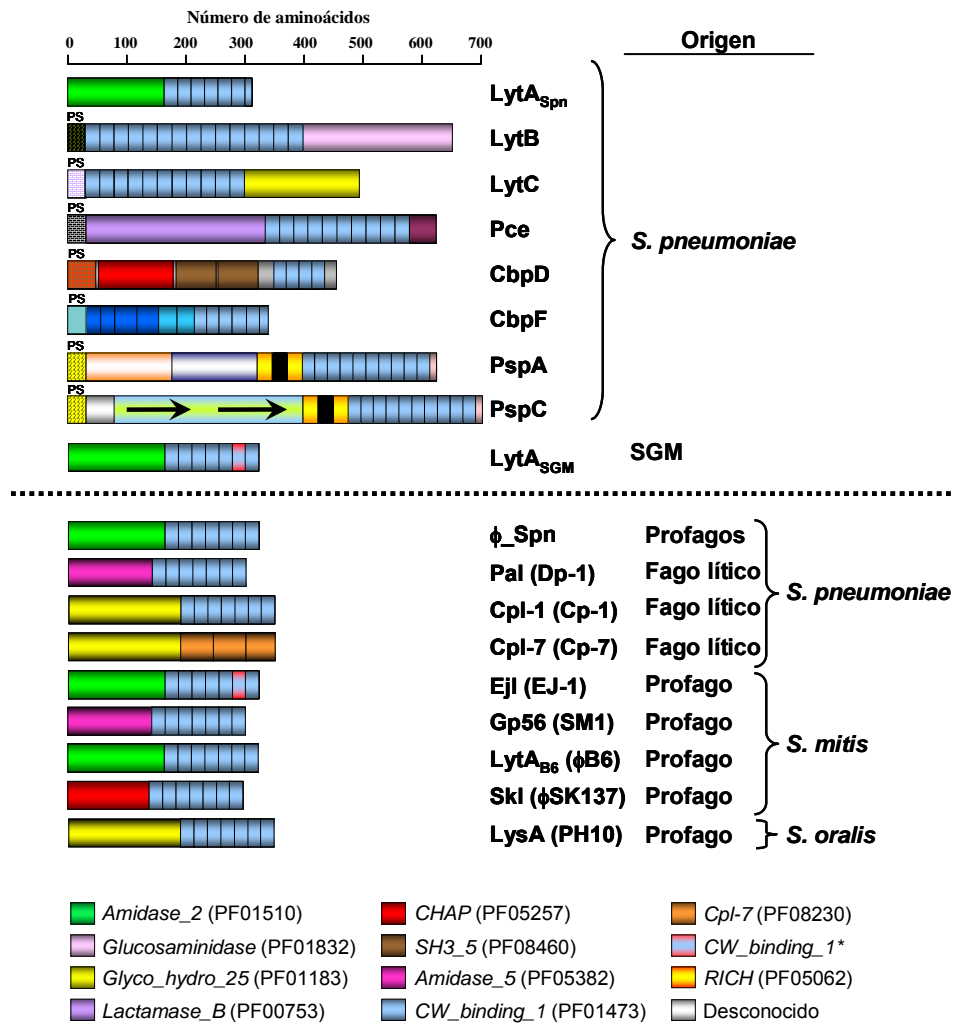


Figura 3. Representación esquemática de la organización modular de algunas CBPs de *S. pneumoniae* y sus fagos. También se muestran otras CBPs de SGM y sus fagos. Los diferentes módulos han sido denominados como se indica en la base de datos Pfam (versión 25.0) (Finn *et al.*, 2010). El asterisco indica una CBR conteniendo una deleción característica de dos aminoácidos encontrada en NAM-amidasas LytA de SGM y alguno de sus fagos (Obregón *et al.*, 2002; Llull *et al.*, 2006a; Morales *et al.*, 2010). PS, péptido señal.

más recientemente se ha puesto en evidencia la implicación de varias de las CBPs en otros procesos tales como la formación de biofilmes (Moscoso *et al.*, 2006), la tolerancia frente a glicopéptidos (Moscoso *et al.*, 2010, 2011), la transformación genética (Moscoso y Claverys, 2004; Kausmally *et al.*, 2005,) o el denominado “fratricidio” por el cual la inducción del estado de competencia para transformación genética induce la síntesis, en las células competentes, de una serie de proteínas (incluidas varias CBPs) que lisan a otros neumococos no competentes que están presentes en el mismo hábitat (Claverys y Håvarstein, 2007).

Por otro lado, y puesto que una de las características de esta familia de proteínas es su localización en la superficie bacteriana, existe otro grupo de CBPs implicadas principalmente en la interacción con el hospedador, como PspA, PspC, PcpA o CbpG, que tienen importancia en la adhesión y colonización del mismo, en la evasión del sistema inmune así como en la degradación de proteínas de la matriz extracelular (Jedrzejewski, 2006; Mann *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Frolet *et al.*, 2010). Algunas CBPs pueden desempeñar ambos papeles, es decir, degradar enlaces en la pared celular y participar en interacciones con el hospedador esenciales para el desarrollo de la IPD (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011).

Con excepción del fago Cp-7 cuya enzima lítica (endolisina) (Cpl-7) es la única, en el sistema de neumococo y sus fagos, capaz de degradar paredes celulares conteniendo colina o no (García *et al.*, 1990; Bustamante *et al.*, 2010) (Fig. 3), tanto los fagos líticos (virulentos) (García *et al.*, 1987b, 1988a, 1990; Sheehan *et al.*, 1997) como atemperados (Romero *et al.*, 1990a, b; Romero *et al.*, 2009a) de neumococo codifican enzimas líticas de pared (endolisinas) pertenecientes a la familia de las CBPs. Asimismo, otros profagos de *S. mitis* (Díaz *et al.*, 1992; Siboo *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2004a, b; Llull *et al.*, 2006b) y *S. oralis* (van der Ploeg, 2010) también codifican endolisinas que son CBPs. Igualmente, existe evidencia de la existencia, además de las endolisinas, de otras proteínas codificadas por algunos de esos fagos que también son capaces de unirse a los residuos de colina (Lopez *et al.*, 1982; García *et al.*, 2005; Mitchell *et al.*, 2007) (Fig. 3). Es importante resaltar que, aproximadamente, el 60% de los aislados clínicos de *S. pneumoniae* contienen profagos (Ramirez *et al.*, 1999; Romero *et al.*, 2009b) y que todos ellos codifican endolisinas muy similares a la NAM-amidasa LytA de neumococo (Romero *et al.*, 2009a; Morales *et al.*, 2010) (Fig. 3). En marcado contraste con estos datos, los fagos líticos de neumococo codifican, o bien lisozimas (como es el caso de los fagos de la familia Cp; Cpl-1 y Cpl-7; García *et al.*, 1987b, 1990; Hermoso *et al.*, 2003) o bien

una NAM-amidasa (Pal; fago Dp-1) (García *et al.*, 1984) pero de una familia (*amidase_5*) diferente a la de LytA de *S. pneumoniae* LytA_{Spn} (*amidase_2*) (Fig. 3).

2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

Una vez establecido el estado de portador, *S. pneumoniae* puede diseminarse y colonizar e invadir el oído medio (produciendo otitis media), los pulmones (neumonía), el cerebro (meningitis) o la sangre (bacteriemia). No obstante, la aparición o no de síntomas de infección demuestra la importancia de determinados factores de interacción entre el hospedador y la bacteria (Preston y Dockrell, 2008; Henriques-Normark y Normark, 2010). Uno de los principales factores que determinan el tipo de relación hospedador-patógeno es el serotipo capsular (Weinberger *et al.*, 2010); así, los neumococos de los serotipos 3, 6B y 19F son los más virulentos en adultos, mientras que los de serotipos 1, 4, 5, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F son los principales causantes de enfermedad invasiva en niños (Henriques *et al.*, 2000). Además, existen otros factores del hospedador que también influyen en la interrelación con el patógeno, tales como la edad (mayor incidencia de enfermedad neumocócica en niños menores de 5 años y adultos mayores de 65 años), el estado inmunológico (personas inmunodeprimidas son más propensas a desarrollar enfermedad), la posible invasión previa del sistema respiratorio por otros agentes patógenos, como el virus de la gripe que potencia la capacidad de neumococo para colonizar, desarrollar enfermedad o ambos (McCullers, 2006; Wang *et al.*, 2011) o diversos factores genéticos, muchos de ellos no bien definidos todavía, que aumentan la susceptibilidad del hospedador a sufrir una infección neumocócica (Brouwer *et al.*, 2009).

Se pueden distinguir principalmente tres etapas en el proceso de patogénesis: adhesión/colonización, invasión, e inflamación y *shock*.

2.1. Adhesión/colonización

En la nasofaringe, *S. pneumoniae* se enfrenta a las barreras naturales de la mucosa respiratoria del hospedador, al sistema inmune y a otros patógenos que colonizan el mismo hábitat. Existen dos primeras barreras que pueden impedir, siquiera en parte, que neumococo colonice la mucosa respiratoria: el moco y la lisozima (Coonrod *et al.*, 1991; Nelson *et al.*, 2007b; Shimada *et al.*, 2008). Para superar estas barre-

ras, *S. pneumoniae* ha desarrollado varias estrategias. La evasión del moco tiene lugar mediante tres vías. En primer lugar, el CPS no se une a los residuos de ácido siálico presentes en la mucosa por su carga negativa, disminuyendo así la probabilidad de atrapamiento (Nelson *et al.*, 2007b). En segundo lugar, neumococo tiene varias exoglicosidasas (NanA, NanB, BgaA y StrH; ver más adelante) que degradan los glicoconjugados del moco, disminuyendo así la viscosidad del mismo y evitando el atrapamiento de la bacteria (Tong *et al.*, 2001; King *et al.*, 2006; Burnaugh *et al.*, 2008). En tercer lugar, la neumolisina Ply, una citolisina tiol-activada con afinidad por el colesterol, produce poros en las membranas celulares, disminuyendo los movimientos ciliares de las células epiteliales y permitiendo que neumococo se adhiera a las mismas con más facilidad sin ser eliminado (Feldman *et al.*, 1990, 2002). En este proceso, la pared celular (Geelen *et al.*, 1993) y, en particular, los residuos de colina de los TAs, reconocen las moléculas del receptor del factor de activación plaquetaria (PAF) de la superficie celular y se unen a él (Cundell *et al.*, 1995).

La lisozima es un muramidasa que rompe el peptidoglicano bacteriano hidrolizando los enlaces que unen las moléculas acetiladas del peptidoglicano bacteriano [*N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc)]; para evitarlo, neumococo posee dos enzimas, una GlcNAc desacetilasa A (PdgA) y una *O*-acetiltransferasa (Adr) de los residuos de MurNAc, que le confieren resistencia a la lisozima (Vollmer y Tomasz, 2000, 2002; Crisóstomo *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2008). Ambas enzimas han demostrado ser importantes durante la colonización y, aunque se ha propuesto que los dobles mutantes *pgdA adr* poseen una eficacia biológica menor que la de la cepa salvaje, la ventaja de conseguir una resistencia completa a la lisozima podría compensar esa deficiencia (Davis *et al.*, 2008).

En la mayoría de las bacterias la adhesión se lleva a cabo a través de proteínas de superficie que se unen a carbohidratos del hospedador pero, de manera análoga, el microorganismo también puede interactuar con otras proteínas tanto del plasma como de la matriz extracelular eucariótica (Bergmann y Hammerschmidt, 2006; Kadioglu *et al.*, 2008). Así, se han descrito seis exoglicosidasas neumocócicas: las neuraminidasas (sialidasas) NanA (Cámara *et al.*, 1994), NanB (Berry *et al.*, 1996) y, la recientemente descrita en algunas cepas, NanC (Pettigrew *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2011), las β -galactosidasas BgaA (Zähner y Hakenbeck, 2000) y BgaC (Jeong *et al.*, 2009) y la β -*N*-acetilglucosaminidasa StrH (Clarke *et al.*, 1995). Además de lo ya señalado con anterioridad, la función de estas proteínas es, actuando aparentemente de manera coordinada, poner de manifiesto receptores glicosilados

que facilitarían la adhesión del patógeno a las células del hospedador (King *et al.*, 2006; Burnaugh *et al.*, 2008; Jeong *et al.*, 2009; King, 2010) así como, en una fase posterior de la infección, reducir la fijación del complemento a la superficie de la bacteria aumentando así la resistencia de ésta a la fagocitosis por los neutrófilos humanos (Dalia *et al.*, 2010).

Se han descrito otras proteínas de la superficie de neumococo (adhesinas) implicadas en adhesión como son algunas CBPs (García *et al.*, 2000b; Swiatlo *et al.*, 2004; López *et al.*, 2004; Hakenbeck *et al.*, 2009) (Tabla 1) que, como se ha comentado previamente, se caracterizan por reconocer específicamente la colina de los TAs y LTAs de la pared bacteriana como sitio de anclaje. Además, neumococo sintetiza otras proteínas de superficie (Bergmann y Hammerschmidt, 2006) como las proteasas HtrA e Iga —que son proteínas que se unen covalentemente a la pared celular mediante una secuencia LPXTG y la acción de una sortasa [para revisiones recientes, véase Ton-That *et al.* (2004), Desvaux *et al.* (2006), Marraffini *et al.* (2006) y Hendrickx *et al.* (2011)]— además de lipoproteínas como PsaA que poseen un importante papel en adhesión a las células del hospedador. Aproximadamente, una tercera parte de los neumococos sintetizan pili (Barocchi *et al.*, 2006; Aguiar *et al.*, 2008; Moschioni *et al.*, 2008), un hecho que se daba por descartado hasta muy recientemente (Proft y Baker, 2009; Soriani y Telford, 2010; Kreikemeyer *et al.*, 2011). Los pili de neumococo, que participan en una mejor adhesión de aquellas cepas que los poseen (Löfling *et al.*, 2011), se sintetizan a partir de los productos génicos situados en islotes de patogenicidad de los que, hasta la fecha, se conocen dos, denominados *rliA* (o PI-1) y PI-2 (LeMieux *et al.*, 2006; Bagnoli *et al.*, 2008).

En la mucosa nasofaríngea, neumococo es atacado por los componentes del sistema inmune innato del hospedador tales como la IgA secretora (sIgA) (Janoff *et al.*, 1999), la lactoferrina (Shaper *et al.*, 2004), y los componentes del sistema del complemento (Picard *et al.*, 2003; Bogaert *et al.*, 2010). La sIgA interfiere en la unión de neumococo a la mucosa nasofaríngea (Kurono *et al.*, 1991; Kaetzel, 2001) y facilita la opsonización de las bacterias, lo que permite la fagocitosis por las células presentadoras de antígeno y neutrófilos (Janoff *et al.*, 1999). *S. pneumoniae* tiene varias estrategias para evitar la opsonización por sIgA; por una parte, la cápsula interfiere con la unión de sIgA (Fasching *et al.*, 2007). Cuando, no obstante, la IgA se une a la cápsula, es digerida por Iga, la proteasa neumocócica de IgA1. La proteasa se une a sIgA en la región bisagra, inhibe la opsonización mediada por la sIgA y facilita la adhesión del microorganismo a la mucosa respiratoria (Weiser *et al.*, 2003).

La lactoferrina se encuentra en varios fluidos corporales, incluyendo la saliva y las secreciones nasales (Raphael *et al.*, 1989) y actúa como bacteriostático al secuestrar el hierro necesario para el metabolismo bacteriano. Además, esta proteína está presente en los neutrófilos y puede aumentar la fagocitosis y la muerte bacteriana (Esposito *et al.*, 1990). Para contrarrestar la acción de la lactoferrina, *S. pneumoniae* sintetiza PspA (proteína A de superficie; una CBP) que se une al sitio activo de la apolactoferrina humana inhibiendo la actividad de la misma (Shaper *et al.*, 2004; Senkovich *et al.*, 2007). Un tercer componente importante de la inmunidad innata de las mucosas es el sistema del complemento. La activación del complemento da lugar a la opsonización y posterior fagocitosis, al reclutamiento de leucocitos y al ensamblaje del complejo de ataque a la membrana (MAC) (Walport, 2001; Bogaert *et al.*, 2010; Paterson y Orihuela, 2010b). El complemento tiene un papel fundamental en la respuesta inmune frente a *S. pneumoniae* habiéndose comprobado que, pacientes con deficiencias en el sistema del complemento, son más susceptibles a la transición desde la colonización al desarrollo de la IPD (Ram *et al.*, 2010) (para una descripción más detallada del sistema del complemento, véase más adelante).

S. pneumoniae ha desarrollado varias estrategias para limitar la opsonofagocitosis mediada por el complemento. El CPS tiene un papel central, al limitar la cantidad de complemento depositado en la superficie e impedir el acceso a los receptores del complemento (Hyams *et al.*, 2010). Por otra parte, varias proteínas de superficie (LytC, PspC, PspA, PsaA y PhpA), además de Ply, contribuyen a la reducción del depósito del complemento (Zhang *et al.*, 2001; Jarva *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2004; Quin *et al.*, 2005, 2007; Ochs *et al.*, 2008; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). PspC, también conocida como CbpA, SpsA y PbcA, es una CBP, capaz de unir C3b del complemento —lo que impide la opsonización— y factor H (fH) humano (Dave *et al.*, 2004; Quin *et al.*, 2005), un factor que inhibe la activación de dos componentes del complemento de las vías alternativa y de las lectinas (véase Apto. 2.4.2). Además, algunos alelos de PspC se unen a la proteína inhibidora del complemento (proteína de unión a C4b o C4BP) (Dieudonné-Vatran *et al.*, 2009) que bloquea la activación de la vía clásica. Por otra parte, *S. pneumoniae* sintetiza la proteína

Tabla 1. Algunas proteínas de superficie de *S. pneumoniae* implicadas en adhesión

Proteína ^a	Función	Referencia
<u>CBP</u>		
LytA	NAM-amidasa (EC 3.5.1.28). Principal autolisina	(Ronda <i>et al.</i> , 1987; Gosink <i>et al.</i> , 2000)
LytB	N-acetilglucosaminidasa. Separación de las células al final de la división	(García <i>et al.</i> , 1999b; Gosink <i>et al.</i> , 2000; Ramos-Sevillano <i>et al.</i> , 2011)
LytC	Lisozima (EC 3.2.1.17). Autolisina a 30°C	(García <i>et al.</i> , 1999a; Gosink <i>et al.</i> , 2000)
Pce	Fosforilcolín esterasa. Hidrolasa de pared celular. Se une a plasminógeno	(Gosink <i>et al.</i> , 2000; Attali <i>et al.</i> , 2008)
CbpD	Peptidoglicán hidrolasa	(Gosink <i>et al.</i> , 2000)
PspA	Proteína A de superficie de neumococo. Se une a lactoferrina humana	(Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1999)
PspC	Proteína C de superficie de neumococo. Se une al factor H del sistema del complemento	(Dave <i>et al.</i> , 2001)
CbpG	Proteína de unión a colina G. Posible serín-proteasa	(Gosink <i>et al.</i> , 2000)
<u>LPXTG</u>		
NanA	Neuraminidasa	(Uchiyama <i>et al.</i> , 2009; Banerjee <i>et al.</i> , 2010)
HtrA	Serín-proteasa	(Sebert <i>et al.</i> , 2002)
IgA	Zinc metaloproteasa de IgA1	(Weiser <i>et al.</i> , 2003)
RrgA	Adhesina de los pili	(Nelson <i>et al.</i> , 2007a; Moschioni <i>et al.</i> , 2010; Izoré <i>et al.</i> , 2010)
PsrP	Adhesina glicosilada, de alto peso molecular y rica en serina	(Löfling <i>et al.</i> , 2011)
<u>Lipoproteínas</u>		
PsaA	Lipoproteína transportadora de manganeso. Se une a cadherina E	(Johnston <i>et al.</i> , 2004; Anderton <i>et al.</i> , 2007)
<u>Otras</u>		
PavA	Proteína A de adhesión y virulencia. Se une a fibronectina	(Holmes <i>et al.</i> , 2001; Pracht <i>et al.</i> , 2005; Kadioglu <i>et al.</i> , 2010)
Eno	Fosfopiruvato hidratasa (α -enolasa) (EC 4.2.1.11). Se une a plasminógeno	(Attali <i>et al.</i> , 2008)
GapA	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.2.1.12). Se une a plasminógeno	(Attali <i>et al.</i> , 2008)

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

PhpA capaz de degradar el componente C3 (Hostetter, 1999; Zhang *et al.*, 2001).

Un mecanismo de defensa importante del sistema inmune innato de las vías respiratorias (Gould y Weiser, 2001) es el proporcionado por la proteína C-reactiva (CRP), que es producida por el hígado durante la fase aguda de la infección (Macintyre *et al.*, 1982). La CRP se encarga de la eliminación de las células dañadas, la regulación de la respuesta inflamatoria o ambas, dentro de las diversas funciones que tiene en el sistema inmune (Marnell *et al.*, 2005; Windgassen *et al.*, 2011). La CRP también estimula la síntesis de citoquinas y quimioquinas por unión directa a receptores de leucocitos (Eklund, 2009). La CRP se une a residuos de fosforilcolina presentes en células apoptóticas (Kim *et al.*, 2003) y varias bacterias, incluyendo a neumococo (Volanakis y Kaplan, 1971; Thompson *et al.*, 1999). Mediante su unión a la superficie celular bacteriana, la CRP puede activar la vía clásica del complemento a través del factor del complemento 1q (C1q) (Suresh *et al.*, 2006) haciendo que la fagocitosis sea más eficiente. Además, la CRP puede unirse al receptor Fc γ en los macrófagos y células dendríticas, lo que favorece la fagocitosis (Mortensen y Duszkievicz, 1977; Thomas-Rudolph *et al.*, 2007) y la producción de citoquinas (Mold y Du Clos, 2006). Algunos trabajos apuntan que el papel protector de la proteína CRP frente a neumococo, radica en su actuación sobre las células efectoras de la respuesta inmune (Suresh *et al.*, 2007). Estudios en modelos murinos de infección utilizando CRP humana inyectada intravenosamente o utilizando animales transgénicos que expresan CRP humana, han evidenciado una reducción en la concentración de la bacteria en sangre sólo cuando CRP es inyectada en las etapas tempranas de la infección, lo que sugiere que CRP actúa más de manera profiláctica que terapéutica (Agrawal *et al.*, 2008).

2.2. Invasión

La transcitosis es una importante estrategia utilizada por neumococo en la invasión del organismo que facilita, además, la existencia de reservorios bacterianos intraepiteliales y la recolonización posterior de la nasofaringe. Normalmente, neumococo atraviesa las células eucarióticas, sin multiplicarse, en el interior de vacuolas. Se han descrito dos mecanismos por los que *S. pneumoniae* es capaz de atravesar la barrera epitelial: 1) Como ya se mencionó anteriormente, la fosforilcolina de los TAs y LTAs puede unirse al receptor del PAF y activar las células epiteliales y endoteliales (Cundell *et al.*, 1995). Al unirse la fosforilcolina al receptor del PAF, neumococo

puede acceder a la membrana basal de la célula epitelial del hospedador y así producir IPD (Radin *et al.*, 2005). En ratones deficientes en el receptor del PAF se observó una reducción no sólo en las tasas de colonización neumocócica, sino también en el desarrollo de la neumonía e IPD (Rijneveld *et al.*, 2004). Es interesante resaltar el hecho de que, como consecuencia de la infección de ciertos virus respiratorios como el de la gripe, el virus respiratorio sincitial o el coronavirus NL63, se produce un incremento notable en la biosíntesis del receptor del PAF (García *et al.*, 2010; Yokota *et al.*, 2010; Golda *et al.*, 2011), aunque no está claro que este hecho esté directamente relacionado con una co-infección o posterior infección con neumococo, la gravedad de la misma o ambas (McCullers *et al.*, 2008; Golda *et al.*, 2011). 2) Un segundo mecanismo consiste en la unión de la proteína PpsC a la porción extracelular (ectodominio o componente secretor) del receptor de las inmunoglobulinas poliméricas (pIgR) (Hammerschmidt *et al.*, 1997, 2000). En condiciones normales, el pIgR, que se expresa ampliamente en las células epiteliales del tracto respiratorio, permite el transporte de la IgA o IgM poliméricas a través de las barreras epiteliales, desde la zona basolateral hacia el lumen apical (Kaetzel, 2005). Adoptando la maquinaria de transcitosis inversa, la unión de neumococo al pIgR a través de PspC conduce a la internalización y transcitosis de la bacteria a través de las capas epiteliales. PspC ha demostrado ser un factor importante para la colonización y enfermedad invasiva, aunque su efecto sobre la virulencia puede variar entre las cepas de neumococo (Zhang *et al.*, 2000; Brock *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2010; Asmat *et al.*, 2011).

La migración pericelular (o paracelular) es otro mecanismo por el que las bacterias pueden atravesar capas de células epiteliales o endoteliales (Pancholi *et al.*, 2003). El plasminógeno, junto con las proteínas de neumococo que unen plasminógeno (Eno, GapA y Pce) (Tabla 1), tiene un papel central en este proceso. Por una parte, el plasminógeno, una proenzima, incrementa la adhesión de los neumococos a la superficie epitelial. En segundo lugar, la activación de plasminógeno a plasmina, una serín proteasa de amplia actividad, permite a ésta unirse a las proteínas implicadas en las uniones estrechas intercelulares y degradar la cadherina del endotelio vascular (Attali *et al.*, 2008), un componente esencial de tales uniones (Dejana *et al.*, 2008). La ruptura de las uniones estrechas, puede permitir el acceso a neumococo a la membrana basal y, así, producir una posterior enfermedad invasiva. También hay datos experimentales que indican que Ply es capaz de abrir las uniones estrechas permitiendo el paso de neumococo (Rayner *et al.*, 1995).

En el lado basal del epitelio o endotelio se encuentra la membrana basal, que se compone principalmente de una red de colágeno tipo I, laminina y proteoglicanos (Alberts, 2009). Al igual que muchas bacterias, neumococo usa la hialuronato liasa (SpnHL) (Jedrzejewski, 2007) para degradar los principales componentes de la matriz extracelular que son el ácido hialurónico y ciertos glicosaminoglicanos (Maruyama *et al.*, 2009), facilitando así el desarrollo de la enfermedad invasiva. La fibronectina, es una glicoproteína que se encuentra en casi todos los tejidos humanos y, es probable que neumococo a través de las proteínas PavA y PavB se una a ella (Holmes *et al.*, 2001; Paterson y Orihuela, 2010a; Jensch *et al.*, 2010). Posiblemente, PavA no solo sirva para unirse directamente a la fibronectina sino que también desempeñe un papel en la mediación efectiva de la adherencia y virulencia de otros determinantes, hasta ahora desconocidos (Pracht *et al.*, 2005).

2.3. Inflamación y shock

La liberación de productos bacterianos, muchos de ellos altamente inmunogénicos, puede conducir a una respuesta inflamatoria descontrolada en el hospedador que se ha dado en denominar “tormenta de citoquinas” (*cytokine storm*). De hecho, la mayor parte del daño tisular y orgánico que tienen lugar durante la infección neumocócica, tanto en la neumonía (Calbo y Garau, 2010) como en la meningitis (Gerber y Nau, 2010) se producen como consecuencia de un estado inflamatorio excesivo y es esta situación la que ocasiona el *shock* que tiene lugar en muchos casos de infección causada por *S. pneumoniae* (Calbo y Garau, 2011).

Las interacciones que ocurren entre neumococo y su hospedador durante la evolución de la infección son complejas. En un modelo murino de infección pulmonar neumocócica se distinguieron 5 etapas (Bergeron *et al.*, 1998): en la primera, la producción de citoquinas varió según el lugar; así, en el lavado broncoalveolar, aparecen TNF- α (factor de necrosis tumoral- α), IL-6 (interleuquina-6) y óxido nítrico (NO); IL-1 en el tejido pulmonar y, en el suero, IL-6. La segunda etapa está marcada por la multiplicación de neumococo en el alveolo y la quimiotaxis de neutrófilos dentro del tejido pulmonar. En la tercera etapa, se manifiesta el daño pulmonar debido a la acción citolítica de Ply. La cuarta etapa se caracteriza por el fuerte incremento de la actividad de monocitos y linfocitos en el tejido pulmonar y, en la etapa final, se produce un daño masivo del tejido coincidente con altos niveles de NO, proliferación bacteriana y muerte.

Durante el desarrollo de la meningitis, TNF- α e IL-1 β son importantes citoquinas pro-inflamatorias que, en pacientes con meningitis bacteriana, se incrementan en el líquido cefalorraquídeo en las primeras etapas de la infección. IL-6, una citoquina con actividades pro-inflamatoria y anti-inflamatoria, y el interferón gamma (IFN- γ) aumentan sus niveles en la fase aguda en varios modelos de infección. El IFN- γ es una de las principales citoquinas de la vía de los linfocitos-T colaboradores. Asimismo, se observa la sobreproducción de un buen número de quimioquinas (citoquinas con actividad quimiotáctica que reclutan células del sistema inmune al sitio de la infección) en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con meningitis (Mook-Kanamori *et al.*, 2011).

2.4. El sistema del complemento

El sistema del complemento es parte de la primera línea de defensa del sistema inmune innato (Lambris *et al.*, 2008; Trouw y Daha, 2011) y está integrado por, aproximadamente, unas 30 proteínas tanto plasmáticas (solubles) como unidas a las membranas celulares que, después de reconocer al microorganismo invasor, inician una cascada regulada de reacciones (Walport, 2001). Este sistema tiene varias funciones: en primer lugar, permite la opsonización de microorganismos (con o sin la lisis de los mismos); por otro lado, reconoce anticuerpos, creando así una conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa al activar la respuesta inmunológica celular; por último, el sistema del complemento también contribuye a la producción de citoquinas que actúan como mediadores quimiotácticos en la respuesta inflamatoria (Markiewski y Lambris, 2007). Además de otras vías de activación descubiertas recientemente, como las que relacionan el sistema del complemento con la cascada de coagulación sanguínea o con diversas células fagocíticas (Ehrthaller *et al.*, 2011), existen tres vías de activación del sistema del complemento: las denominadas clásica, alternativa y la de las lectinas (Fig. 4).

La vía clásica se activa principalmente debido a la unión antígeno-anticuerpo mediante unión y activación del complejo C1 que está formado por los componentes C1q, C1r y C1s. El componente C1 puede unirse a las bacterias directamente, mediante unión a CRP (Janeway, 2005) o por la unión a IgM naturales al polisacárido C de neumococo (una denominación clásica de los TAs) (Mold *et al.*, 2002). Asimismo, C1q se puede unir a SIGN-R1, una lectina tipo-C (Kang *et al.*, 2006). Ratones deficientes en C1q muestran una respuesta inmune notablemente alterada y un

peor pronóstico, en un modelo de meningitis (Rupprecht *et al.*, 2007). Resultados similares se han obtenido con ratones que carecen de SIGN-R1 (Kang *et al.*, 2006). Una vez que tiene lugar dicha unión, ocurren cambios conformacionales en C1q que producen la auto-activación de C1r el cual, subsecuentemente, activa a C1s, permitiendo que el complejo C1 desencadene la producción de C4 y, posteriormente, C2, para generar C4b2a que es la convertasa del componente C3 de la vía clásica (Walport, 2001). Esta convertasa se encarga de que el C3 activo genere C3b que es capaz de unirse a la superficie del patógeno. El componente C1q también es capaz de reconocer determinados patógenos y eliminar complejos inmunes al unirse al receptor 1 del complemento (CR1) (Klickstein *et al.*, 1997). Por otra parte, Ply se une a la porción Fc de las IgGs potenciando la activación de la vía clásica, el aumento de la virulencia bacteriana independientemente del agotamiento de los factores del complemento y limitando la opsonofagocitosis (Alcantara *et al.*, 2001)

La vía alternativa se activa por la unión covalente de pequeñas cantidades de C3b a grupos hidroxilo de carbohidratos y proteínas de la superficie neumocócica (aunque dicha unión no depende de un reconocimiento específico) (Winkelstein y Tomasz, 1978; Winkelstein *et al.*, 1980); posteriormente, el factor B, una peptidasa, se une a C3b, lo que determinará una amplificación de la activación del complemento. La importancia de la vía alternativa en la opsonización de *S pneumoniae* se puso en evidencia, además, en ratones con déficit de factor D, otra peptidasa implicada en la activación de la vía alternativa; en este estudio, la opsonofagocitosis de *S. pneumoniae* se retrasó en los ratones deficientes en factor D en comparación con ratones de tipo salvaje, lo que indica un papel importante de esta vía del complemento en las primeras fases de la infección (Xu *et al.*, 2001). Asimismo, ratones deficientes en factor B, son más susceptibles a la otitis media neumocócica (Tong *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011).

La vía de las lectinas se inicia cuando lectinas de unión a manosa (MBL) o ficolinas se unen, de una forma dependiente de calcio, a carbohidratos que contienen residuos de GlcNAc o manosa (Teizo *et al.*, 2004; Ip *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2011). Las MBL, también denominadas colectinas, son lectinas de tipo C que forman interacciones múltiples y cuya estabilidad depende de la distribución y la geometría de los azúcares. Tanto las MBL como las ficolinas forman complejos con serín proteasas tipo 2 (MASP-2) que permiten la formación de C4 y C2, originando posteriormente la misma convertasa de C3 producida a partir de la vía clásica. Por otra parte, se ha observado que la ficolina L se une a neumococos de unos pocos serotipos

(11F, 11A y 11D de un total de 20 serotipos diferentes ensayados) pero no a neumococos no capsulados (Krarup *et al.*, 2005). Debido a que las MBL tienen una estructura muy similar a C1q, se ha sugerido que también pueden unirse a CR1 y, en consecuencia, podrían existir grandes paralelismos hasta ahora insospechados entre las vías clásica y de las lectinas en la activación del sistema del complemento (Wallis *et al.*, 2010). La vía del complemento inducida por lectinas parece ser menos importante en la infección neumocócica que la clásica o la alternativa. Los polimorfismos en la MBL, una de los activadores principales de esta vía, no parecen asociarse con un mayor riesgo de IPD (Moens *et al.*, 2006) aunque un meta-análisis más reciente encontró una asociación entre la susceptibilidad a la IPD y la homocigosis para uno de los tres polimorfismos del gen *MBL2* (Brouwer *et al.*, 2009). Más recientemente incluso, se ha sugerido la existencia de algún tipo de asociación entre la deficiencia en MBL y el serotipo del neumococo productor de IPD (Vallès *et al.*, 2010).

2.4.1. Activación del componente C3b y formación del MAC

El componente C3b juega un papel clave en la inmunidad mediada por el sistema del complemento ya que es el componente en el que convergen las tres vías del mismo. Una vez que se ha formado el componente C3b, éste es capaz de actuar como una opsonina al reconocer los microorganismos e inducir la fagocitosis a través del receptor del complemento CR1. Por otro lado, el componente iC3b que es un componente originado de la hidrólisis de C3b (Sahu y Lambris, 2001), también es capaz de inducir fagocitosis a través de los receptores del complemento CR3 y CR4. Para la mayoría de los microorganismos, incluido neumococo, la fagocitosis es el principal mecanismo de eliminación del parásito por parte del hospedador.

Una vez que se ha formado el componente C3b, éste es capaz de unirse a las convertasas de C5 (C4b2a3b y C3bBb3b) dando lugar al componente C5. Posteriormente, C5 puede originar los componentes C5a, que es una potente anafilotoxina, y C5b, que es el componente que inicia la formación del MAC. Para ello, es necesario que se produzca de forma rápida la unión de los componentes C5b y C6 ya que, de lo contrario, cambios conformacionales en C5b impedirían la posterior formación del MAC. Una vez que se ha formado el complejo C5b-6, éste adquiere naturaleza hidrofóbica al unirse el componente C7 de modo que el nuevo complejo

formado (C5b-7) es capaz de insertarse en la bicapa lipídica que constituye la membrana externa de la bacteria (Kondos *et al.*, 2010).

Posteriormente, se inserta el componente C8 que es el que regula el número de moléculas de C9 que polimerizan en la membrana. Se cree que es necesario entre seis y nueve moléculas de C9 para que se origine un poro que altere la estructura de la membrana bacteriana y de este modo se produzca la lisis celular, aunque el tamaño del poro varía en función del número de moléculas de C9 que participen en la formación del mismo. Es interesante resaltar las evidencias recientes que indican la existencia de homología entre el MAC, las perforinas y las citolisinas dependientes de colesterol, siendo Ply integrante de este grupo (Gilbert, 2010). En cualquier caso, hay que hacer notar que, mientras las bacterias Gram-negativas son lisadas por el MAC, las Gram-positivas poseen una gruesa pared celular que dificulta notablemente la penetración del MAC hasta la membrana bacteriana (Joiner *et al.*, 1983; Moffitt and Frank, 1994; Zipfel *et al.*, 2007).

2.4.2. Regulación

La activación descontrolada del sistema del complemento es nociva para el hospedador y, por ello, este sistema debe estar estrechamente regulado y así limitar la formación de C3b o prevenir la inserción del MAC. La regulación está mediada por componentes solubles localizados en el plasma y por proteínas asociadas a membranas celulares (Fig. 5). Los reguladores solubles son C4BP, fH y el inhibidor de C1 (C1INH) que reprimen la activación del complemento al reducir la producción de convertasa de C3. El principal regulador negativo de la vía clásica y de la vía de las lectinas es C4BP que se une a C4b y actúa como un cofactor del factor I (fI), en la ruptura de C4b a C4d que es hemolíticamente inactivo. Además, C4BP puede producir una disociación irreversible de la convertasa de C3 de la vía clásica (C4b2a) inactivando de este modo la vía clásica y la vía de las lectinas de manera conjunta (Blom *et al.*, 2003).

El factor H, es el principal regulador negativo de la vía alternativa, controla la activación del sistema del complemento mediante 3 mecanismos. Por un lado, actúa como un cofactor del fI en la ruptura e inactivación de C3b a iC3b (Sahu y Lambris, 2001). También participa en la inactivación de la vía alternativa al disociar la conver-

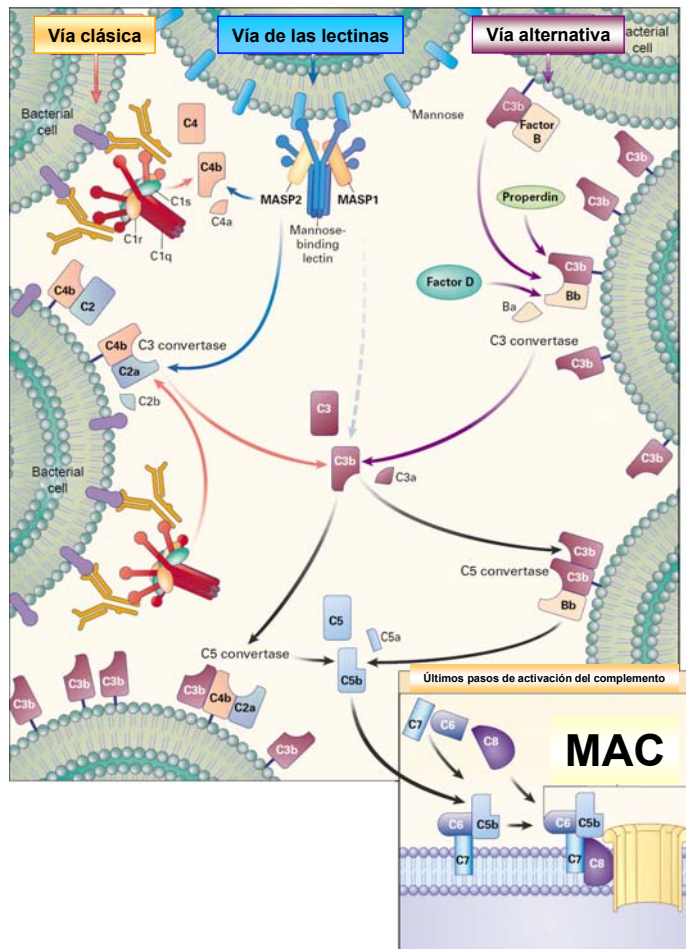


Figura 4. Activación de las tres vías del sistema del complemento. Reproducido de Walport (2001), con permiso.

tasa de C3 de la vía alternativa (C3bBb) en C3b y factor Bb. Por último, fH es capaz de competir con el factor B por la unión al C3b inactivando también de esta forma la activación de la vía alternativa. La proteína S (también denominada vitronectina) y la clusterina (Falgarone y Chiocchia, 2009), son proteínas plasmáticas que inhiben la inserción del complejo C5b-7 en la superficie celular y la polimerización de C9, evitando la formación del MAC y bloqueando de este modo la activación de la vía

terminal del sistema del complemento (Singh *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha observado que *S. pneumoniae* (Bergmann *et al.*, 2009) y otras bacterias (Chhatwal *et al.*, 1987) se unen a vitronectina, lo que facilita la adhesión del microorganismo a las células epiteliales y su posterior internalización. Existen otros reguladores negativos del complemento que son receptores asociados a membranas de las células del hospedador como son CR1, CD46, CD55 y CD59.

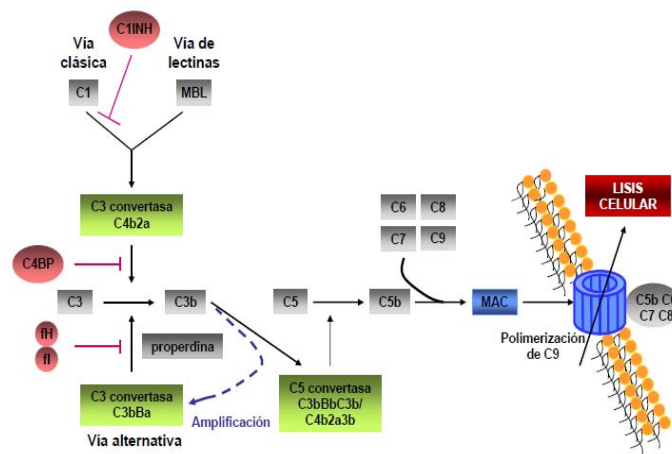


Figura 5. Regulación del sistema del complemento. Reproducido de Schneider *et al.* (2007), con permiso.

La properdina, es el único regulador positivo del sistema del complemento que se conoce hasta el momento. Aunque su concentración en el plasma es baja, es esencial para la activación de la vía alternativa del complemento ya que es capaz de estabilizar la convertasa C3bBb (Kemper *et al.*, 2010).

3. CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOFILMES DE *S. PNEUMONIAE*

3.1. Características de los biofilmes microbianos

En muchos hábitats naturales y artificiales, las bacterias forman comunidades sésiles denominadas biopelículas o biofilmes. Un biofilm se puede definir como una comunidad microbiana sésil muy estructurada que se caracteriza por células bacterianas unidas a una superficie o interfase y embebidas en una matriz extracelular de sustancias producidas por ellas (Costerton *et al.*, 1995). Las células que forman parte de un biofilm exhiben un fenotipo alterado con respecto a sus equivalentes de vida libre o planctónica en cuanto a su tasa de crecimiento y patrones de expresión génica. En la actualidad, se considera que, bajo condiciones ambientales adecuadas, todos los microorganismos son capaces de formar biofilmes. En la Tabla 2 se recogen algunas de las principales características de los biofilmes entre las que destacan la heterogeneidad, la diversidad de microambientes y la resistencia a los agentes antimicrobianos y mecanismos de defensa del sistema inmune del hospedador. Un biofilm puede estar formado por una única especie bacteriana pero, lo más frecuente, es que esté constituido por varias así como por hongos, algas, protozoos, residuos y productos de corrosión. Los habitantes del biofilm, pertenezcan a una misma especie o a diversos grupos de microorganismos, se distribuyen en micronichos originando así microambientes diferenciados en pH, concentración de iones y tensión de oxígeno.

Los microorganismos asociados en biofilmes colonizan una amplia variedad de tejidos naturales, dispositivos médicos e implantes artificiales y están implicados en más del 80% de las enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas incluyendo la periodontitis, la otitis media, la endocarditis, las úlceras gastrointestinales, las infecciones del sistema urinario e infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística (Costerton *et al.*, 1995; 1999; Wolcott y Ehrlich, 2008; Schaudinn *et al.*, 2009). La importancia de los biofilmes en la microbiología médica radica en la significativamente menor susceptibilidad a los antibióticos que presentan las bacterias que adoptan este tipo de crecimiento y a su mayor capacidad para eludir los sistemas de defensa inmune del hospedador (Bryers, 2008; Lewis, 2008; Jensen *et al.*, 2010). Se ha demostrado la capacidad de los biofilmes para persistir en concentraciones de antibióticos y biocidas entre 100 y 1000 veces superiores a las que inhiben a las células planctónicas (El-Azizi *et al.*, 2005). Esta mayor resistencia se ha

atribuido a la dificultad que podrían tener los agentes antimicrobianos para penetrar en el biofilm, a la replicación más lenta de las bacterias en este estado biológico, a la aparición de microambientes modificados dentro del biofilm, y a la generación de células persistentes (Anderson y O'Toole, 2008). La mayoría de las infecciones humanas asociadas a biofilmes están causadas por sistemas monoespecie, siendo éstos los más estudiados (O'Toole, 2004). La dificultad para tratar las infecciones asociadas a la formación de biofilmes ha llevado a proponer varios criterios de diagnóstico para calificar a un biofilm como agente etiológico de una infección (Hall-Stoodley y Stoodley, 2009): 1) la infección está localizada; 2) el patógeno está asociado a una superficie; 3) el examen directo del tejido infectado muestra las bacterias en acúmulos rodeadas de una matriz propia o formada por componentes del hospedador; 4) la infección es refractaria al tratamiento antibiótico a pesar de la susceptibilidad demostrada de las formas planctónicas; 5) en ausencia de cultivo, la presencia de bacterias viables en el biofilm se demuestra mediante tinción de viabilidad *in situ* o por *reverse transcriptase*-PCR (RT-PCR); 6) la ineficacia de los mecanismos de defensa del hospedador se pone de manifiesto por la localización de las macrocolonias en áreas discretas del tejido asociadas con células inflamatorias.

3.1.1. Formación de un biofilm

La formación de un biofilm es un proceso complejo y se inicia con la adherencia de los microorganismos sobre una superficie abiótica o un tejido o en la interfase aire-líquido. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie de forma irreversible, comienza a dividirse alrededor del sitio de unión formando una microcolonia (Fig. 6). Posteriormente, las bacterias comienzan a secretar componentes que forman parte de la matriz del biofilm y adoptan estructuras tridimensionales (macrocolonias), entre las cuales se observa un sistema de canales que facilitan el transporte de nutrientes y sustancias de desecho. Tras la maduración del biofilm, algunas bacterias se liberan del mismo y colonizan nuevas superficies, cerrando así el proceso de desarrollo del biofilm.

Tabla 2. Características generales de un biofilm

Composición	70–97 % agua 2–5 % microorganismos 1–2 % exopolisacáridos <1–2 % proteínas <1–2 % ácidos nucleicos		
Propiedades	Adherencia Resistencia a los agentes antimicrobianos Protección frente a los anticuerpos y la fagocitosis Mayor capacidad para captar nutrientes Crecimiento ralentizado Comunicación interbacteriana Heterogeneidad		
Arquitectura	Compleja Moldeable Sistema de canales Microambientes		
Impacto	Industria	Contaminación o <i>biofouling</i>	
	Medio Ambiente	Biorremediación Biocontrol	
	Salud humana	Papel protector	Acidificación del pH vaginal Prevención de la caries dental Polímeros extracelulares de interés biotecnológico
		Infección	Catéteres e implantes médicos Cronicidad

3.1.2. Regulación del proceso de formación de un biofilm

Existen evidencias experimentales que sugieren que el proceso de formación de un biofilm está regulado por una gran variedad de factores. Además de las respuestas a señales físicas y químicas, las bacterias regulan diversos procesos fisiológicos de una manera dependiente de la densidad celular, llamada comúnmente *quorum sensing*. Las bacterias secretan constantemente bajos niveles de estas señales y las detectan a través de los receptores correspondientes. Los receptores no inducen cambios en el comportamiento hasta que no hay suficientes bacterias para permitir que la concentración de la señal exceda un nivel crítico. Cuando este nivel se al-

canza, las bacterias responden adoptando cambios de comportamiento en comunidad como, por ejemplo, la formación de biofilmes.

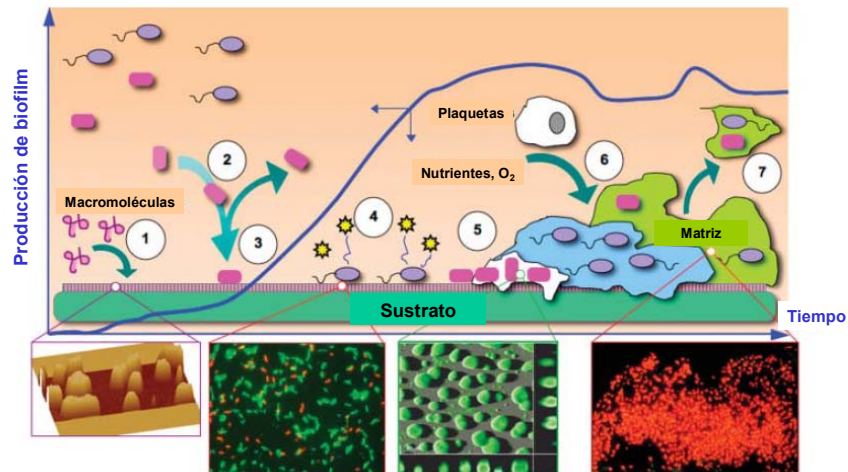


Figura 6. Etapas de formación de un biofilm. La curva en azul representa la acumulación neta del biofilm en función del tiempo sobre un sustrato no colonizado. Inicialmente (punto 1) se produce la adsorción de macromoléculas a la superficie y las bacterias se depositan en el sustrato a través de diferentes mecanismos de transporte (punto 2). Una vez que las bacterias se han adherido de forma irreversible (punto 3) se comunican por sistemas de señales *quorum sensing* (punto 4) que regulan la expresión de determinados genes y comienzan a secretar diferentes polímeros (polisacáridos, proteínas, oligonucleótidos) (punto 5) formando la matriz extracelular del biofilm. Las bacterias del biofilm consumen nutrientes del ambiente y atraen a otras especies bacterianas o a células del hospedador (punto 6). Finalmente, algunas bacterias o fragmentos del biofilm se pueden desprender y trasladarse a otra zona (punto 7). En la parte inferior del esquema se incluyen diferentes imágenes del desarrollo de un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*; de izquierda a derecha: imagen de un sustrato de vidrio tras un pretratamiento proteico realizada con un microscopio de fuerza atómica, imagen al microscopio de fluorescencia de las bacterias adheridas al sustrato teñidas con el kit de viabilidad bacteriana *BacLight*, imagen CLSM de diferentes macrocolonias del biofilm y tomografía óptica de un biofilm maduro teñido con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y clortetraciclina. Reproducido de Bryers (2006), con permiso.

Las moléculas que constituyen las llamadas señales *quorum sensing* son las que modulan la expresión de determinados genes en los microorganismos que forman

parte del biofilm. En bacterias Gram-negativas, el principal autoinductor es la acil-homoserina lactona, que puede difundir a través de la membrana celular, mientras que, en bacterias Gram-positivas, las moléculas autoinductoras suelen ser pequeños péptidos lineales o cíclicos que inicialmente se sintetizan como un pro-péptido de mayor tamaño dentro de la célula y que, posteriormente, serán procesado durante la secreción (Costerton *et al.*, 1995; Suntharalingam y Cvitkovitch, 2005; Dickson, 2010). Otros sistemas *quorum sensing* que participan en la comunicación interespecífica se basan en una molécula señal descrita originalmente como autoinductor-2 (AI-2) y que se ha identificado como una furanona (Lönn-Stensrud *et al.*, 2007). Como veremos más adelante, una estrategia novedosa para controlar el crecimiento microbiano en biofilmes consiste en interferir en los sistemas de comunicación celular por medio de análogos de las moléculas *quorum sensing*.

El proceso de formación de un biofilm está sometido también a una regulación postranscripcional. Parece que el activador alostérico di-GMP cíclico controla la síntesis de diversos componentes celulares implicados tanto en la movilidad como en la producción de matriz extracelular en respuesta a cambios ambientales (Valle *et al.*, 2003; Jonas *et al.*, 2009). La concentración de este activador depende de dos actividades enzimáticas, la diguanilato ciclasa y la fosfodiesterasa, asociadas a enzimas que contienen los motivos GGDEF y EAL (Ausmees *et al.*, 2001).

3.2. Biofilmes de *S. pneumoniae*

Aunque los primeros estudios de biofilmes neumocócicos se remontan a hace 10 años o más, en los últimos cinco ha habido un aumento de trabajos en los que se examinan los biofilmes neumocócicos a nivel estructural y genético. Varios autores han detectado recientemente biofilmes de *S. pneumoniae* en la superficie de las glándulas adenoides y de las mucosas de las células epiteliales en niños con infecciones recurrentes del oído medio y otitis media con otorrea (Hall-Stoodley *et al.*, 2006; Coates *et al.*, 2008; Hoa *et al.*, 2009; Nistico *et al.*, 2011) así como en la mucosa de pacientes con rinosinusitis crónica (Sanderson *et al.*, 2006). De igual forma, se ha puesto de manifiesto la presencia de estructuras tipo biofilm en los pulmones de ratones infectados con *S. pneumoniae* mediante el modelo de biofilm de flujo continuo (Sanchez *et al.*, 2010). En general, los distintos laboratorios utilizan una variedad de enfoques diferentes para desarrollar *in vitro* los biofilmes de patógenos humanos con el objetivo de obtener una herramienta adecuada que simule el am-

biente de la infección *in vivo*. El primer sistema para el estudio de los biofilmes de neumococo se basó en el uso de filtros de celulosa llamados *Sorbarods* y se describió en 1997 como un medio para evaluar la susceptibilidad *in vitro* de las bacterias del biofilm a los antibióticos (Budhani y Struthers, 1997). Posteriormente, se utilizó el crecimiento de neumococo sobre los filtros *Sorbarod* en un sistema de cultivo continuo para imitar las condiciones que se producen durante el estado de portador y la colonización nasofaríngea (Waite *et al.*, 2001). Otros grupos de investigación han desarrollado reactores biológicos para poder estudiar así el proceso de formación de biofilm *in situ* en tiempo real (Donlan *et al.*, 2004; Goeres *et al.*, 2005). Asimismo, se ha utilizado un sistema de cultivo continuo a través de una celda de flujo para describir cómo *S. pneumoniae* adopta múltiples fenotipos a lo largo del desarrollo del biofilm (Allegrucci *et al.*, 2006). En el laboratorio donde se ha desarrollado esta Tesis, se ha puesto a punto un modelo *in vitro* de biofilmes adaptado para *S. pneumoniae*, utilizando como soporte placas multipocillo de poliestireno y placas con fondo de cristal, que ha permitido estudiar el efecto de diversos factores ambientales (nutrientes, cambios en el pH, osmolaridad, temperatura, etc.) en el desarrollo del biofilm (Moscoso *et al.*, 2006) y la detección rápida de mutantes defectivos en su formación (Muñoz-Elías *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha propuesto que, en neumococo, el sistema *quorum sensing* que regula el desarrollo de la competencia para transformación genética, influye en la colonización del tracto respiratorio (Kowalko y Sebert, 2008). En relación a este hecho, se ha demostrado que la inducción del sistema de competencia mediada por el péptido estimulador de la competencia (CSP) promueve la formación estable del biofilm *in vitro* (Oggioni *et al.*, 2006), aunque su impacto varía dependiendo del modelo experimental utilizado (Trappetti *et al.*, 2011a).

3.2.1. Factores ambientales que afectan a la formación de biofilm

La fuente de carbono, la velocidad de flujo o las propiedades físicas de la superficie a la que las bacterias se adhieren, tales como la hidrofobicidad y la rugosidad, pueden alterar la estructura y la composición de los biofilmes producidos por un microorganismo dado (O'Toole y Kolter, 1998; Stoodley *et al.*, 1999). En un trabajo previo de nuestro grupo, se analizó, por primera vez, la influencia de varios factores ambientales en la formación del biofilm neumocócico (Moscoso *et al.*, 2006). La capacidad de *S. pneumoniae* para formar biofilmes en superficies abióticas se examinó utilizando diversos materiales como cloruro de polivinilo,

examinó utilizando diversos materiales como cloruro de polivinilo, poliestireno o vidrio, obteniéndose los mejores resultados en las superficies de poliestireno. Además, la intensa producción de biofilm que se observó cuando se utilizaron medios de cultivo definidos o semisintéticos (CpH8) sugiere que la formación de biofilm representa una estrategia de supervivencia en un medio ambiente limitado nutricionalmente, ya que el uso de medios ricos en nutrientes tuvo como resultado una débil formación de biofilm sobre placas de poliestireno o vidrio. Asimismo, el enriquecimiento del medio CpH8 con aditivos como el extracto de levadura o la seroalbúmina bovina (BSA) no favoreció significativamente la formación de biofilm *in vitro*. Además, el incremento de la osmolaridad (con concentraciones de NaCl por encima de 0.2 M) inhibió notablemente el crecimiento y la formación de los biofilmes. Las variaciones en el pH inicial también pueden afectar a la formación de biofilm, obteniéndose un desarrollo de biofilm óptimo cuando el pH inicial del medio de cultivo es de 7.0–8.0 (Moscoso *et al.*, 2006).

3.2.2. Estructura del biofilm neumocócico

Los estudios iniciales sobre la formación de biofilmes de neumococo en superficies abióticas tales como poliestireno y vidrio, han revelado que este microorganismo en su forma no capsulada forma estructuras tridimensionales de, aproximadamente, 25–30 μm de espesor, tanto en observaciones con el microscopio de barrido láser confocal (CLSM) (Fig. 7) como con el microscopio electrónico de barrido a bajas temperaturas (LTSEM). Estos estudios también demostraron la presencia de pequeños huecos y canales que separan las microcolonias dentro del biofilm. Las imágenes al LTSEM muestran que las agrupaciones bacterianas adoptan estructuras que se asemejan a panales (Moscoso *et al.*, 2006) y que proporcionarían estabilidad mecánica al biofilm neumocócico y podrían servir como un importante factor de virulencia, ayudando a mantener a las bacterias alejadas de las defensas del hospedador, como se ha descrito en otras comunidades microbianas (Schaudinn *et al.*, 2007; Moscoso *et al.*, 2009). Mediante el uso de reactores biológicos de flujo continuo, otros autores han sugerido que la arquitectura de los biofilmes maduros de *S. pneumoniae* difiere significativamente entre los serotipos analizados (Allegrucci *et al.*, 2006).

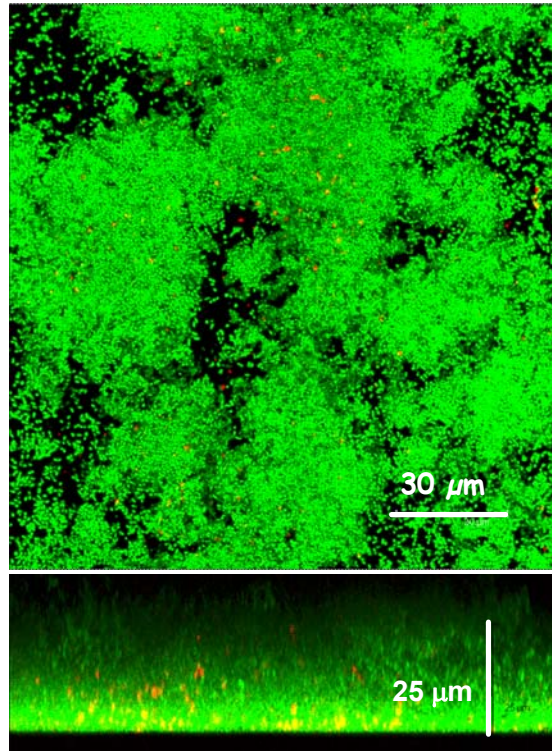


Figura 7. Imagen CLSM de la viabilidad de un biofilm de *S. pneumoniae* R6 teñido con el *kit* BacLight donde se visualizan las bacterias viables con fluorescencia en verde y las no viables con fluorescencia en rojo. Modificado de Moscoso *et al.* (2006).

3.2.3. Matriz extracelular del biofilm neumocócico

Las células bacterianas en un biofilm están embebidas en una matriz extracelular que está compuesta por diversas sustancias poliméricas extracelulares (EPS), incluyendo exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Las EPS determinan la arquitectura tridimensional del biofilm y proporcionan la integridad estructural y la cohesión del mismo. Además, las EPS también contribuyen a la resistencia a

los antimicrobianos y defensas del hospedador, permiten la acumulación de nutrientes del medio ambiente y la eliminación de material celular. Por otra parte, la presencia de ADN en la matriz extracelular puede facilitar la transferencia horizontal de genes entre las células del biofilm (Flemming y Wingender, 2010).

Previamente, se ha demostrado que la presencia de ADN y de proteínas extracelulares o expuestas en la superficie bacteriana son elementos importantes de la matriz extracelular del biofilm de *S. pneumoniae*, necesarios tanto para la adhesión inicial como para el mantenimiento del biofilm, ya que al añadir DNasa I o proteasas antes o después de la formación del biofilm, se observó un efecto inhibitorio y desintegrador significativo sobre el desarrollo y la estructura del biofilm, respectivamente (Moscoso *et al.*, 2006; Hall-Stoodley *et al.*, 2008; Carrolo *et al.*, 2010). Recientemente, se ha propuesto que la inducción espontánea de fagos puede constituir una importante fuente de ADN extracelular para la matriz del biofilm (Carrolo *et al.*, 2010).

Los polisacáridos son una fracción importante de la matriz extracelular y proporcionan principalmente la estabilidad mecánica del biofilm. Los polisacáridos extracelulares se han clasificado como polisacáridos capsulares, cuando el polímero está estrechamente asociado a la superficie de la célula bacteriana, o exopolisacáridos, cuando están ligeramente unidos a ella (Branda *et al.*, 2005). Sin embargo, esta distinción no es fácil de apreciar en los biofilmes ya que muchos de los polisacáridos extracelulares producidos en los biofilmes son insolubles y no pueden separarse fácilmente de las células. Varios trabajos han documentado que los mutantes neumocócicos no capsulados presentan mayores propiedades de adhesión y son más propensos que las cepas capsuladas a formar biofilmes *in vitro* (Waite *et al.*, 2001, 2003; Moscoso *et al.*, 2006; Allegrucci y Sauer, 2007). Así, se ha demostrado que el CPS, el principal factor de virulencia de neumococo como ya se ha explicado anteriormente, constituye una barrera física parcial para la formación del biofilm (Moscoso *et al.*, 2006). Una menor producción de CPS parece incrementar la adhesión de *S. pneumoniae* a las células del hospedador y la invasión bacteriana de la nasofaringe durante el establecimiento del estado de portador (Weiser, 2004). Por tanto, se ha sugerido que la capacidad de neumococo para regular la expresión de la cápsula podría desempeñar un papel fundamental en la transición del estado de portador, adoptando un modo de vida sésil, hacia la enfermedad invasiva en vida planctónica (Waite *et al.*, 2001). La monitorización en tiempo real de *S. pneumoniae*

en un reactor biológico ha permitido detectar y cuantificar espectroscópicamente proteínas y polisacáridos durante la formación del biofilm (Donlan *et al.*, 2004).

3.2.4. Patrones de expresión génica y producción proteica

Es bien sabido que las bacterias que crecen en biofilmes presentan cambios fisiológicos y metabólicos en comparación con las células planctónicas. Por lo tanto, las diferentes etapas de desarrollo del biofilm, tales como la adhesión inicial y la maduración del biofilm, probablemente requieren una expresión génica diferente a la que se produce en un cultivo planctónico. Los patrones de expresión génica de la cepa de *S. pneumoniae* TIGR4 recuperada de tejidos de ratones con neumonía o meningitis parecen ser similares a los de los neumococos que crecen en biofilmes para casi todos los genes estudiados, pero no así cuando las bacterias crecen en sangre; en este caso, la expresión génica es similar a la de los cultivos líquidos de neumococo en fase exponencial (Oggioni *et al.*, 2006). Se ha observado que las células sésiles de un biofilm son más efectivas en la inducción de la meningitis y la neumonía que las células planctónicas (Oggioni *et al.*, 2006). En este sentido, se ha descrito que la formación de biofilm es más frecuente entre los aislamientos de *S. pneumoniae* obtenidos de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística que entre los aislados de sangre (García-Castillo *et al.*, 2007). Sin embargo, otros estudios concluyen que no existe ninguna correlación entre la capacidad de formar biofilmes *in vitro* y el origen de los aislados neumocócicos o la manifestación clínica de la enfermedad neumocócica (Lizcano *et al.*, 2010; Tapiainen *et al.*, 2010).

Los estudios de proteómica han revelado la existencia de un incremento en el número de proteínas sintetizadas *de novo* y diferencias en los patrones de producción de proteínas durante el desarrollo del biofilm de *S. pneumoniae*. Mediante espectrometría de masas se han identificado algunas proteínas producidas diferencialmente durante el desarrollo del biofilm que están implicadas en virulencia, adhesión y resistencia. La neumolisina Ply y la piruvato oxidasa SpxB, dos proteínas asociadas con la virulencia de neumococo, fueron las más abundantes de *S. pneumoniae* tipo 3 en los biofilmes después de 3 y, en menor medida, 6 días de incubación (Allegrucci *et al.*, 2006). Además, en los biofilmes de 3 días de crecimiento se encontraron altas concentraciones de la subunidad α del fragmento F₁ de la H⁺-ATPasa, de la piruvato quinasa activada por fructosa y de varias proteínas asociadas a la superficie celular como la enolasa, la metionina sulfóxido reductasa MsrA y

la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Allegrucci *et al.*, 2006). En general, las enzimas implicadas en glucólisis, gluconeogénesis y metabolismo del almidón, como la glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP, la glucosa-6-fosfato isomerasa y la fosfoglicerato quinasa, son más abundantes en condiciones de crecimiento planctónico.

Nuestro grupo ha demostrado que los residuos de colina de los ácidos teicoicos de la pared celular, a los cuales se unen las CBPs, tienen un papel fundamental en el desarrollo del biofilm neumocócico ya que después de la incubación de neumococo en presencia de altas concentraciones de colina (o de su análogo, etanolamina) que inhiben la actividad enzimática y producen la liberación de la superficie celular de algunas CBPs (López *et al.*, 2004), se observó una notable reducción en la formación de biofilmes (Moscoso *et al.*, 2006). Asimismo, se ha demostrado que algunas CBPs, como las mureín-hidrolasas LytA, LytB y LytC, la proteína A de superficie (PspA) y las adhesinas PcpA y CbpA, contribuyen, en diverso grado, a la formación de biofilm de cepas no capsuladas de *S. pneumoniae* (Moscoso *et al.*, 2006). Más recientemente, se ha propuesto que la neuraminidasa NanA y la proteína rica en repeticiones de serina (PsrP) (codificada por un gen localizado en una isla de patogenicidad presente en algunas cepas de *S. pneumoniae*), participan en el proceso de maduración del biofilm de *S. pneumoniae*. Usando un modelo modificado de formación de biofilm *in vitro*, en el que se permite la interacción previa de los neumococos con células epiteliales respiratorias humanas, se demostró que la neuraminidasa NanA libera residuos terminales de ácido siálico de los glicoconjugados de las células del hospedador y contribuye a la formación de biofilm (Parker *et al.*, 2009). Igualmente, se ha propuesto que la denominada “región básica” de PspR (por poseer un pI de 9.9), está involucrada en la formación de biofilmes maduros y promueve la formación de agregados bacterianos en la nasofaringe y pulmones de ratones infectados (Sanchez *et al.*, 2010).

3.2.5. Terapia contra los biofilmes de *S. pneumoniae*

Uno de los problemas más importantes y persistentes que presentan los biofilmes es la tolerancia inherente de estas comunidades a la terapia antibiótica y a los mecanismos de defensa del hospedador. Se han desarrollado diferentes estrategias para la prevención y el tratamiento de las infecciones relacionadas con los biofilmes, tales como el uso de enzimas que degraden la matriz del biofilm, inhibidores

de las señales *quorum sensing*, agentes antimicrobianos y anticoagulantes, agentes tensioactivos y el uso de bacteriófagos específicos (algunos de los cuales producen despolimerasas, es decir, enzimas específicas que hidrolizan los polisacáridos de la matriz del biofilm) (Kaplan, 2010). Existen estudios de fagos usados individualmente, como T4 que produce la dispersión de los biofilmes de *Escherichia coli* (Doolittle *et al.*, 1995; Corbin *et al.*, 2001) o el fago 456 que reduce la formación de los biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* asociados a catéteres (Curtin y Donlan, 2006). Para prevenir la formación de biofilmes por otras bacterias, se ha propuesto la aplicación tópica de una mezcla de bacteriófagos en la superficie de los dispositivos médicos (Azeredo y Sutherland, 2008; Fu *et al.*, 2010) o bien mejorar la eficacia del tratamiento mediante la adición de los bacteriófagos (o sus despolimerasas) y, posteriormente, desinfectantes (Flemming y Wingender, 2010).

Hasta la fecha, sólo hay un número reducido de publicaciones sobre el uso de antibióticos contra la formación de biofilmes neumocócicos y los datos científicos son insuficientes o no concluyentes. Uno de los primeros trabajos realizados en este sentido reflejó que la formación de biofilmes de una cepa de *S. pneumoniae* susceptible a penicilina no confería protección frente a la bencilpenicilina, la ampicilina, la amoxicilina-ácido clavulánico o la cefuroxima (Budhani y Struthers, 1997). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la amoxicilina, la eritromicina y el levofloxacino, utilizadas a concentraciones superiores a la MIC, son menos activas contra los biofilmes que frente a las células planctónicas (del Prado *et al.*, 2010). Asimismo, se ha observado que el cefditoren, una cefalosporina oral de tercera generación, tiene una mayor capacidad para interferir en el desarrollo del biofilm de *S. pneumoniae* que el uso de la amoxicilina-ácido clavulánico (Maestre *et al.*, 2010) y, de igual forma, el moxifloxacino, una fluoroquinolona de cuarta generación suministrada por vía oral, es capaz de inhibir la formación del biofilm (Roveta *et al.*, 2007).

II. OBJETIVOS

Se ha estimado que los biofilmes están implicados en más de la mitad de las infecciones bacterianas humanas y, hasta en un 80%, en las infecciones crónicas. Además, las infecciones causadas por bacterias patógenas asociadas a la formación de biofilmes se muestran refractarias tanto a los agentes antimicrobianos como a los mecanismos de defensa del sistema inmunitario del hospedador. Todo ello nos ha llevado a plantear la necesidad de desarrollar nuevas vías de investigación en bacterias de importancia clínica relevante como es el caso de *S. pneumoniae*. Hasta el momento, el modo de vida sésil de *S. pneumoniae* apenas ha sido investigado y, sin embargo, la otitis media, y, posiblemente, la neumonía y la meningitis son enfermedades neumocócicas asociadas a la formación de biofilmes.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los objetivos experimentales que nos planteamos investigar en la presente Tesis son los siguientes:

- 1. Búsqueda de nuevos genes implicados en la formación de biofilm.**
- 2. Determinar el papel del polisacárido capsular en la formación de biofilm de *S. pneumoniae*.**
- 3. Investigar la composición de la matriz extracelular de los biofilmes neumocócicos.**
- 4. Estudiar los mecanismos de evasión del sistema inmune por parte de un biofilm.**
- 5. Desarrollar y evaluar posibles medidas terapéuticas contra los biofilmes.**

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ESTIRPES BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS

Las estirpes bacterianas, los plásmidos y los oligonucleótidos utilizados durante el desarrollo de esta tesis están detallados en las Tablas 3 a 6.

Tabla 3. Estirpes bacterianas de *S. pneumoniae*

Estirpe	Descripción ^a	Referencia/Origen ^b
406	S3 ⁺ , ST180 (7, 15, 2, 10, 6, 1, 22)	García <i>et al.</i> (1993)
1001	S3 ⁺ , ST180 (7, 15, 2, 10, 6, 1, 22)	J. Liñares, IDIBELL
1037	S19F ⁺ de sangre	A. Fenoll, ISCIII
1041	S19A ⁺ de sangre	A. Fenoll, ISCIII
1061	S19A ⁺ de otitis	A. Fenoll, ISCIII
1064	S19F ⁺ de otitis	A. Fenoll, ISCIII
1990	S3 ⁺ , ST260 (26, 9, 15, 14, 9, 16, 19)	J. Liñares, IDIBELL
2567	S19F ⁺ de líquido cefalorraquídeo	A. Fenoll, ISCIII
2789	S19F ⁺ de aspirado bronquial	A. Fenoll, ISCIII
2797	S19A ⁺ de aspirado bronquial	A. Fenoll, ISCIII
2998	S19A ⁺ de líquido cefalorraquídeo	A. Fenoll, ISCIII
3086	S3 ⁺ , ST180 (7, 15, 2, 10, 6, 1, 22)	J. Liñares, IDIBELL
3404	S1 ⁺ , ST304 (13, 8, 13, 5, 17, 4, 8)	J. Liñares, IDIBELL
5086	S19A ⁺ , ST81 (4, 4, 2, 4, 4, 1, 1)	J. Liñares, IDIBELL
5294	S1 ⁺ , ST306 (12, 8, 13, 5, 16, 4, 20)	J. Liñares, IDIBELL
6008	S1 ⁺ , ST306 (12, 8, 13, 5, 16, 4, 20)	J. Liñares, IDIBELL
8057	S3 ⁺ , ST260 (26, 9, 15, 14, 9, 16, 19)	J. Liñares, IDIBELL
8069	S1 ⁺ , ST304 (13, 8, 13, 5, 17, 4, 8)	J. Liñares, IDIBELL
82220/19B	S19B ⁺ , ST nuevo (8, nuevo, 14, 4, 17, 3, 14)	Staten Serum Institut
82221/19C	S19C ⁺ , ST nuevo (2, 2, 2, 12, 17, 3, 14)	Staten Serum Institut
Cap3-1	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-2	Mutante parcialmente capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-3	Mutante parcialmente capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-4	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-5	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-6	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-7	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-8	Mutante parcialmente capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-9	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-10	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-11	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-12	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-13	Mutante parcialmente capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-14	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-15	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis

MATERIALES Y MÉTODOS

Cap3-16	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-17	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-18	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-19	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-20	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-21	Mutante parcialmente capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-22	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-23	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-24	Mutante no capsulado derivado de M23	Esta tesis
Cap3-25	Mutante parcialmente capsulado derivado de M23	Esta tesis
G54	S19F ⁺ , ST63 (2, 5, 36, 12, 17, 21, 14)	Dopazo <i>et al.</i> (2001)
M11	Cepa no capsulada derivada de R6, Hex ⁻ , <i>lytA</i> ⁺	García <i>et al.</i> (1985a)
M23	M22 Δ <i>lytA32</i> (S3 ⁺)	García <i>et al.</i> (1993)
M24	Cepa no capsulada derivada de M23; <i>cap3A</i> Δ <i>lytA32</i>	García <i>et al.</i> (1993)
M24Opt	Mutante Opt ^R derivado de M24	Esta tesis
M31	Cepa no capsulada derivada de M11; Δ <i>lytA</i>	Sánchez-Puelles <i>et al.</i> (1986)
M31B	M31, <i>lytB::ermC</i> ; Ery ^R	García <i>et al.</i> (1999b)
M32	Cepa no capsulada derivada de M11; Δ <i>lytA32</i>	López <i>et al.</i> (1986)
P005	M11 (S1 ⁺) ^c	D. Llull, CSIC
P007	M11 (S3 ⁺) ^c	Esta tesis
P015	M11 (S19F ⁺) ^c	Moscoso <i>et al.</i> (2006)
P040	Transformante de R6 con el plásmido pMV158GFP, Tc ^R	Moscoso <i>et al.</i> (2006)
P046	R6, <i>lytA::aphIII</i> ; <i>lytC::ermC</i> , Kan ^R , Ery ^R	Moscoso <i>et al.</i> (2006)
P064	R6, <i>pspC::aad9</i> , Spc ^R	Moscoso <i>et al.</i> (2006)
P124	R6, <i>strH::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Spc ^R , (<i>strH</i> = <i>spr0057</i>)	Esta tesis
P133	R6, <i>endoD::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Spc ^R , (<i>endoD</i> = <i>spr0440</i>)	Esta tesis
P144	R6, <i>bgaA::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Spc ^R , (<i>bgaA</i> = <i>spr0565</i>)	Esta tesis
P147	R6, <i>ciaH</i> _{Tupelo_VT} , VanT	Esta tesis
P153	R6, <i>htrA::aphIII</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Kan ^R	Esta tesis
P163	M32, <i>strH::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Spc ^R	Esta tesis
P164	M32, <i>bgaA::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Spc ^R	Esta tesis
P173	R6, <i>spr0135::cat</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Cm ^R	Esta tesis
P174	R6, <i>spr1223::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Spc ^R	Esta tesis
P175	R6, <i>spr1224::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Spc ^R	Esta tesis
P176	R6, <i>spr1459::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Spc ^R	Esta tesis
P177	R6, <i>phaB::aphIII</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Kan ^R	Esta tesis
P178	R6, <i>spr1655::aphIII</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Kan ^R	Esta tesis
P179	R6, inserción del gen <i>aphIII</i> en la zona promotora de <i>spr0376</i> (factor de transcripción) por mutagénesis <i>mariner</i> , Kan ^R	Esta tesis
P180	R6, <i>spr0136::aphIII</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Kan ^R	Esta tesis
P181	Transformante de M11 con ADN de 5086 (S19A ⁺) ^c	Esta tesis
P182	Transformante de M11 con ADN de 82220/19B (S19B ⁺) ^c	Esta tesis
P184	Transformante de M11 con ADN de 82221/19C (S19C ⁺) ^c	Esta tesis

P186	R6, <i>spr0091::aad9</i> , Spc ^R	Esta tesis
P187	R6, <i>spr0092::aad9</i> , Spc ^R	Esta tesis
P189	R6, <i>spr1223::aphIII</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Kan ^R	Esta tesis
P190	P189, <i>spr1459::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Kan ^R , Spc ^R	Esta tesis
P191	Transformante de M11 con ADN de 1064 (S19F ⁺) ^c	Esta tesis
P192	Transformante de M11 con ADN de G54 (S19F) ^c	Esta tesis
P194	Transformante de P192 con pDLP49 (S19F ⁺ /S37 ⁺), Ln ^R	Esta tesis
P195	R6, <i>galU::aad9</i> por mutagénesis <i>mariner</i> , Spc ^R	Esta tesis
P196	Transformante de R6 con el plásmido pLSE4- <i>spr0091</i> , Ln ^R	Esta tesis
P197	Transformante de R6 con el plásmido pLSE4- <i>spr0092</i> , Ln ^R	Esta tesis
R6	Cepa no capsulada derivada de D39, ST595 (7, 5, 1, 1, 10, 7, 15)	Hoskins <i>et al.</i> (2001)
R6B	R6, <i>lytB::ermC</i> ; Ery ^R	García <i>et al.</i> (1999b)
R6_p13	Derivada de R6 que contiene <i>cap3p₁₃-lacZ</i> , Tc ^R	Esta tesis
R6_p20	Derivada de R6 que contiene <i>cap3p₂₀-lacZ</i> , Tc ^R	Esta tesis
R6_pM23	Derivada de R6 que contiene <i>cap3p_{M23}-lacZ</i> , Tc ^R	Esta tesis
R6_ppLSP1	Derivada de R6 que contiene <i>cap3p_{plSP1}-lacZ</i> , Tc ^R	Esta tesis
S3	S23F ⁺ , ST81 (4,4,2,4,4,1,1), LytA ⁻ , VanT	Sung <i>et al.</i> (2006)
S3 (<i>lytA</i> ⁺)	Transformante de la cepa S3 con pUCSpc- <i>lytA</i> ⁺ ; LytA ⁺ , VanNT, Spc ^R	Moscoso <i>et al.</i> (2010)
SSISP19F/1	S19F ⁺	Staten Serum Institut
Tupelo_VT	Descendiente de la cepa Tupelo, <i>ciaH</i> _{Tupelo_VT} , VanT	Moscoso <i>et al.</i> (2010)
Tupelo_VNT	Descendiente de la cepa Tupelo, <i>ciaH</i> _{Tupelo_VNT} , VanNT	Moscoso <i>et al.</i> (2010)

^a Cm, cloranfenicol; Ery, eritromicina; Kan, kanamicina; Opt, optoquina; Spc, espectinomicina; Tc, tetraciclina; VanNT, no tolerante a Van; VanT, Van-tolerante. GFP, proteína con fluorescencia verde. ST, secuentipo; entre paréntesis, perfil alélico (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl*).

^b CSIC, Consejo Superior de Investigaciones Científicas; IDIBELL, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge; ISCIII, Instituto de Salud Carlos III.

^c Cepa M11 transformada con ADN cromosómico del serotipo capsular correspondiente.

Tabla 4. Otras estirpes bacterianas

Estirpe ^a	Referencia/Origen
<i>Escherichia coli</i>	
C600	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
BL21(DE3)	Studier (1991)
DH5α	Sambrook y Russell (2001)
RB791	Brent y Ptashne (1981)
<i>Staphylococcus aureus</i> 15981	Valle <i>et al.</i> (2003)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CECT 231	CECT
<i>Streptococcus mitis</i> B6	Denapaite <i>et al.</i> (2010)
<i>Streptococcus oralis</i> ^T NCTC 11427	Kilpper-Bälz <i>et al.</i> (1985)
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> ^T CCUG 49455	Arbique <i>et al.</i> (2004)

^T, cepa tipo.

Tabla 5. Plásmidos

Nombre	Descripción ^a	Referencia/Origen
pCIP100	Plásmido recombinante que sobreproduce Cpl-1 derivado de pIN-III(lpp ^P -5)-A3, Amp ^R	Sanz y García, (1990)
pCP700	Plásmido recombinante que sobreproduce Cpl-7 derivado de pIN-III(lpp ^P -5)-A3, Amp ^R	Díaz <i>et al.</i> (1991); Bustamante <i>et al.</i> (2010)
pDLP49	Derivado de pLSE4 que expresa el gen <i>tts</i> que codifica la sintasa del serotipo 37, Ln ^R	Llull <i>et al.</i> (2001a)
pEMcat	Derivado de ColE1 que lleva un minitransposón de 1303 pb que contiene las repeticiones invertidas (IRs) de <i>Himar1</i> y, a 100 pb, flanquea la secuencia del gen <i>cat</i> . Amp ^R y Cm ^R	Akerley <i>et al.</i> (1998)
pET13a/ <i>Himar1</i>	Contiene la transposasa <i>mariner</i> o <i>Himar1</i> , Amp ^R	Lampe <i>et al.</i> (1996)
pGL30	pBR322 conteniendo un inserto BclI (7.5 kb) de ADN de <i>S. pneumoniae</i> , Amp ^R	García <i>et al.</i> (1985b)
pGL100	Plásmido recombinante que sobreproduce LytA derivado de pIN-III(lpp ^P -5)-A3, Amp ^R	García <i>et al.</i> (1987a)
pKER1	(1–6533)	Arrecubieta <i>et al.</i> (1994)
pKER2	(6262–9704)	Arrecubieta <i>et al.</i> (1994)
pKER3	(5493–6354)	Arrecubieta <i>et al.</i> (1994)
pKER4	(4292–6544)	Arrecubieta <i>et al.</i> (1994)
pKER7	(1–3768)	Arrecubieta <i>et al.</i> (1994)
pKER21	(8693–9704)	Arrecubieta <i>et al.</i> (1995)
pLCC14	Plásmido recombinante que sobreproduce LytC derivado de pT7-7, Amp ^R	García <i>et al.</i> (1999a)
pLGL1	(3769–6261)	García <i>et al.</i> (1993); Arrecubieta <i>et al.</i> (1994)
pLGL7	(3769–5493)	Arrecubieta <i>et al.</i> (1994)
pLSE1	Plásmido capaz de replicar en <i>S. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> C600, Ln ^R , Tc ^R	Ronda <i>et al.</i> (1988)
pLSE4	Plásmido capaz de replicar en <i>S. pneumoniae</i> y <i>E. coli</i> C600, Ln ^R	Díaz y García (1990)
pLSE4_a [§]	Derivado de pLSE4 que contiene <i>cap3p</i> ₂₀ . Grupo <u>a</u>	Esta tesis
pLSE4_b [§]	Derivado de pLSE4 que contiene <i>cap3p</i> ₁₃ . Grupo <u>b</u>	Esta tesis
pLSE4-spr0091	Derivado de pLSE4 que contiene el gen <i>spr0091</i>	Esta tesis
pLSE4-spr0092	Derivado de pLSE4 que contiene el gen <i>spr0092</i>	Esta tesis
pLSP1 [§]	Derivado de pLSE4 con delección de un nucleótido entre las cajas –10 y –35 del promotor (<i>cap3p</i>) del operón capsular de serotipo 3 (<i>cap3</i>)	Arrecubieta <i>et al.</i> (datos no publicados)
pMSP11	Plásmido recombinante que sobreproduce Pal derivado de pIN-III(lpp ^P -5)-A3, Amp ^R	Sheehan <i>et al.</i> (1997)
pMV158GFP	Derivado de pMV158; Tc ^R ; porta el gen que codifica GFP bajo el control de un promotor inducible por lactosa	Nieto y Espinosa (2003)
pNE103	Plásmido recombinante que sobreproduce Ejl derivado de pUC18, Amp ^R	Díaz <i>et al.</i> (1992)

pPP2	Plásmido para clonación de promotores (<i>bgaA::tetM-lacZ</i>). No replica en <i>S. pneumoniae</i> . Tc ^R	Halfmann <i>et al.</i> (2007a)
pPP2_a*	Derivado de pPP2 que contiene promotor <i>cap3p₂₀</i> del Grupo <u>a</u> . No replica en <i>S. pneumoniae</i> . Tc ^R	Esta tesis
pPP2_b*	Derivado de pPP2 que contiene promotor <i>cap3p₁₃</i> del Grupo <u>b</u> . No replica en <i>S. pneumoniae</i> . Tc ^R	Esta tesis
pPP2_M23*	Derivado de pPP2 que contiene promotor <i>cap3p_{M23}</i> . No replica en <i>S. pneumoniae</i> . Tc ^R	Esta tesis
pPP2_P1*	Derivado de pPP2 que contiene promotor <i>cap3p_{pl.SP1}</i> . No replica en <i>S. pneumoniae</i> . Tc ^R	Esta tesis
pR409	Derivado de ColE1, que lleva un minitransposón que contiene las IRs de <i>Himar1</i> y flanquea, a 100 pb, la secuencia del gen <i>ermAM</i> . Amp ^R , Ery ^R	Guiral <i>et al.</i> (2005)
pR410	Derivado de pEMcat que lleva un minitransposón de 1337 pb que contiene las IRs de <i>Himar1</i> y, a 100 pb, flanquea la secuencia del gen <i>aphIII</i> . Amp ^R , Kan ^R	Sung <i>et al.</i> (2001)
pR412	Derivado de ColE1 que lleva un minitransposón de 1145 pb que contiene las IRs de <i>Himar1</i> y, a 100 pb, flanquea la secuencia del gen <i>aad9</i> . Amp ^R , Spc ^R	Martin <i>et al.</i> (2000)
pRGR5	Plásmido recombinante que sobreproduce LytB derivado de pT7-7, Amp ^R	De las Rivas <i>et al.</i> (2002)
pTVU1	(5892–7212)	Arrecubieta <i>et al.</i> (1996b)
pUC19	Contiene el gen <i>lacZα</i> , <i>oriColE1</i> , Amp ^R	Yanisch-Perron (1985)
pUCSpc	Derivado de pUC19 que contiene el gen <i>aad9</i> de pR412. Spc ^R . No replica en <i>S. pneumoniae</i> .	Moscoso <i>et al.</i> (2010)
pUCSpc-lytA ⁺	Derivado de pUCSpc que contiene el gen <i>lytA₉₄₉</i> . No replica en <i>S. pneumoniae</i> . Spc ^R	Moscoso <i>et al.</i> (2010)
pUCSpc-spr0091	Derivado de pUCSpc que contiene el gen truncado <i>spr0091</i> . Spc ^R . No replica en <i>S. pneumoniae</i> .	Esta tesis
pUCSpc-spr0092	Derivado de pUCSpc que contiene el gen truncado <i>spr0092</i> . Spc ^R . No replica en <i>S. pneumoniae</i> .	Esta tesis

^a Los números entre paréntesis significan las posiciones de los nucleótidos de la inserción del plásmido incluidos en la secuencia del operón *cap3* (Número de acceso: Z47210). Las cajas –35 y –10 del promotor se encuentran entre las posiciones 5819–5824 y 5841–5846, respectivamente. El punto de inicio de la transcripción se encuentra en el nucleótido 5853. Los genes *cap3A*, *cap3B* y *cap3C* se encuentran, respectivamente, en las posiciones 5911–7095, 7111–8364, 9582 y 8662. Amp, ampicilina; Cm, cloranfenicol; Ery, eritromicina; Ln, Lincomicina; Kan, kanamicina; Spc, espectinomicina; Tc, tetraciclina.

[§] Estos plásmidos poseen el gen *lytA* de neumococo que codifica la NAM-amidasa LytA bajo el control del promotor clonado.

* Estos plásmidos poseen el gen *lacZ* de *E. coli* que codifica la β-galactosidasa bajo el control del promotor clonado.

Tabla 6. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'→3') ^a	Utilización/Localización ^b
135-DN	GTGGTATTATAACTTACTAATTC	143823–143858/c (R6); 3' de <i>spr0135</i>
135-UP_A	ATAGTATTATAGCAATTCTTTGGA	142453–142477 (R6); 5' de <i>spr0135</i>
136-DN_A	CATTTGGTAGATTGACAATTC	144910–144932/c (R6); 3' de <i>spr0136</i>
136-UP	GAGTATTTGAAATATATAGGTGAGAAT	143684–143710 (R6); 5' de <i>spr0136</i>
1223-DN	GACTATGGTCAAATAAATAAATCG	1220486–1220513 (R6); 3' de <i>spr1223</i>
1223-DN_A	GCGTCAAGGCATAACTGACTATGGT	1220471–1220495 (R6); 3' de <i>spr1223</i>
1223-UP	GATTACTAATTACATGACTTCTGCCTC	1221622–1221649/c (R6); 5' de <i>spr1223</i>
1223-UP_A	GTCGATGAGGCTAGCCAATTCATTC	1221588–1221612/c (R6); 5' de <i>spr1223</i>
1224-DN	CTGAATGGAAGCTATCGATTTTCTAG	1221450–1221476 (R6); 3' de <i>spr1224</i>
1224-UP	GAAGGAACAGAGATGCCTATTCCAATC	1222766–1222792/c (R6); 5' de <i>spr1224</i>
1459-DN	GCCTAAATCAATGGCGATAATCCACT	1439705–1439730 (R6); 3' de <i>spr1459</i>
1459-UP	GGAACGGTAAAGGTTACTCAGTTC	1440936–1440960/c (R6); 5' de <i>spr1459</i>
1655-DN	GGTATCCGCTACTTCAGCAATTTCTGC	1627511–1627537 (R6); 3' de <i>spr1655</i>
1655-UP	GACTCTGGGAGGAACCTATCACAAAGATG	1628529–1628556/c (R6); 5' de <i>spr1655</i>
ARB1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC(N) ₁₀ GATAT	Para PCR arbitraria; reconoce parte del transposón
ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	Para PCR arbitraria
bgaA-UP	GAGGTTGTAGATGAAACTGACGAAGTC	571946–571972 (R6)
bgaA-DN	GACCAGGACAAATCGATAAGGACA	579056–579033/c (R6)
CAP3A-1	GAAACAGAGGTTAGGAAAGTAATCAG	(5733–5758); 5' de <i>cap3p</i>
CAP3A-2	TCAGTTCCTACAACAATTTCTAGATGG	(6398–6373/c); <i>cap3A</i>
CAP3A-3	GATACATCTTCAGTTGAAGCTGC	(6187–6209); <i>cap3A</i>
CAP3A-4	ATAACGTACGCGAGTTGCCAAG	(6558–6537/c); <i>cap3A</i>
CAP3A-5	CTGGGACAGCTGATTTATCTCACG	(4640–4663); <i>cap3A</i>
CAP3A-6	AATACCCCTCCGTAACCAAAGCTAGG	(6685–6661/c); <i>cap3A</i>
CAP3A-7	GATACATATAGCGAGGTAAAAGGGC	(6571–6595); <i>cap3A</i>
CAP3A-PR1	TAGCACCCTAAAGACAGTCC	(5964–5944/c); 3' de <i>cap3p</i>
CAP3B-1	CATTGTTGTAGCGAATCGTATGAACG	(7011–7036); 5' de <i>cap3B</i>
CAP3B-2	ACGAGATTACGCTCAGGGTCAAGA	(7667–7644/c); <i>cap3B</i>
CAP3B-3	GTGTGACTGGTAAAGTAGGGTGCT	(7727–7750); <i>cap3B</i>
CAP3B-4	GTTCAGCTCGTGTCAATCTG	(8485–8463/c); 3' de <i>cap3B</i>
CAP3B-5	GGAGCATGTGGATTTCGAGAG	(7506–7526); <i>cap3B</i>
CAP3A-B	CCTGTTCTGGCATCTGAAAATCTG	<i>cap3A-cap3B</i> duplicación del mutante Cap3_3
CAP3B-A	CAGATTTTCAGGATGCCAGGAACAGG	<i>cap3A-cap3B</i> duplicación del mutante Cap3_3
endoD-int	TGGAAGAACACCTGATACTGAACGA	442801–442777/c (R6); <i>endoD</i>
endoD-UP	GGATAAAAAATGTGATTATCATGGTTCTAGAGTTT	441012–441045 (R6); 5' de <i>endoD</i>
MP127	CCGGGGACTTATCAGCCAACC	Interno de los terminales IRs del casete

MP128	TACTAGCGACGCCATCTATGTG	de <i>mariner</i> ; orientación hacia el exterior Adyacente (en 3') al terminal IRL del casete de <i>mariner</i> ; orientación hacia el exterior
MP129	GAATTCCTGCAGCCCGGAAT	Para PCR arbitraria; situado en posi- ción 3' del terminal IRL del casete <i>ma- riner</i>
MP130	CGCGTCAATTCGAGCTCGGGT	Para PCR arbitraria; situado en posi- ción 5' del terminal IRR del casete <i>ma- riner</i>
MP131	CGCTCTTGAAGGGAACATATGTT	Para PCR arbitraria; situado en posi- ción 5' del terminal IRR del casete <i>ma- riner</i>
PCAP3	CGAGGTCATTGGTCAGCAGAAAGTA	(5520–5544); 5' de <i>cap3p</i>
PCAP30	GCTAGAGGACAGCAtgCGGCCATAG	(4930–4954); 5' de <i>cap3p</i>
PCAP31	GTCCTCTTTCTCTAgATTATTAATATTCTCAC	(5901–5870/c); 3' de <i>cap3p</i>
phaB-DN	CCCTCCTTCTTCAAAAACTTTTACAATCAAAAC	376630–376596/c (R6); 3' de <i>phaB</i>
phaB-UP	GCTCAAATACTGTTTTGAGGTTGCAG	375664–375690 (R6); 5' de <i>phaB</i>
spr0091-DN	ATCACAATTAGGGATccATTTTATG	99005–99030/c (R6); 3' de <i>spr0091</i>
spr0091-UP	ATACAATGAAGcttAATATCTGCCTG	98158–98183 (R6); 5' de <i>spr0091</i>
spr0092-DN	TGGGCGGATTCAAGcTtCAACGATTG	100841–100866/c (R6); 3' de <i>spr0092</i>
spr0092-UP	TCCGTCGCTGGATCCGTCAGAAATATG	99885–99910 (R6); 5' de <i>spr0092</i>
StrH-int	GCATGAGTTTGAAGAGGTGTGAT	62864–62886 (R6); <i>strH</i>
StrH-UP	GTAGCGCTTACCTATTTTGGGAAGATTCT	64719–64691/c (R6); 5' de <i>strH</i>

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

^b Los números entre paréntesis indican las posiciones de nucleótidos en la secuencia publicada por Arrecubieta *et al.* (1995) (Número de acceso Z47210); /c significa que la secuencia corresponde a la cadena complementaria a la incluida en la base de datos. El número de acceso de la secuencia de la cepa R6 de neumococo es AE007317.

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas se conservaron congeladas a -80°C en los diferentes medios de cultivo empleados a los que se añadió glicerol al 10% (v/v) (concentración final). En el momento de sembrarlas, los cultivos bacterianos se descongelaron e incubaron en los medios correspondientes a 37°C , a menos que se indique lo contrario, con agitación cuando se trataba de cepas de *E. coli*, *S. aureus* o *S. epidermidis* y sin agitación para las de *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. oralis* y *S. mitis*.

Los cultivos de *E. coli* se sembraron en medio LB (Sambrook *et al.*, 1989), añadiendo agar al 1.5% (p/v) para cultivos en medio sólido. La concentración de antibi-

ótico añadida al medio LB para el cultivo de cepas resistentes fue, salvo que se indique lo contrario, en el caso de *E. coli*, de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ para ampicilina (Amp) ó $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ para tetraciclina (Tc). El crecimiento de los cultivos se siguió por turbidimetría a 600 nm (A_{600}) con un espectrofotómetro Thermo Scientific Helios Epsilon. Los cultivos de *S. aureus* y *S. epidermidis* se inocularon en medio TSB (*Tryptic Soy Broth*) suplementado con glucosa (0.4%) y extracto de levadura (0.3%) (TSBGY).

Para el cultivo de las cepas de *S. pneumoniae* y otros estreptococos se utilizó rutinariamente el medio C ajustado a pH 8.0 (CpH8) (Lacks y Hotchkiss, 1960) suplementado (C+Y) o no con extracto de levadura (Difco) (0.08%). Para el cultivo en medio sólido se utilizaron placas de agar de soja tripticaseína o agar D (dextrosa, 1 g l^{-1} ; NaCl, 5 g l^{-1} ; neopeptona, 5 g l^{-1} ; Tris base, 1.25 g l^{-1} ; extracto de levadura 1.25 g l^{-1} ; casitona, 10 g l^{-1}) suplementado con 5% de sangre desfibrinada de carnero (Oxoid). Ocasionalmente, se emplearon placas de C+Y con agar al 1.5% y catalasa [$250 \text{ unidades (U) ml}^{-1}$; Boehringer Mannheim]. Las concentraciones de antibiótico utilizadas fueron: kanamicina (Kan), $250 \mu\text{g ml}^{-1}$; espectinomocina (Spc), $100 \mu\text{g ml}^{-1}$; eritromicina (Ery), $0.05\text{--}0.2 \mu\text{g ml}^{-1}$; tetraciclina (Tc), $1\text{--}3 \mu\text{g ml}^{-1}$ y cloranfenicol (Cm), $4.5 \mu\text{g ml}^{-1}$. Las cepas de neumococo que contenían derivados del plásmido pLSE1 (Ronda *et al.*, 1988) se seleccionaron suplementando el medio correspondiente con $0.6 \mu\text{g ml}^{-1}$ de lincomicina (Ln). La multiplicación de los cultivos de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus* se siguió por turbidimetría a 550 nm (A_{550}) con un espectrofotómetro Thermo Scientific Helios Epsilon o por nefelometría (N) con el empleo de un nefelómetro HACH 2100N, calibrado para el recuento de células viables donde $1 \text{ N} \approx 2 \times 10^6$ unidades formadores de colonias (UFC) ml^{-1} en el caso de *S. pneumoniae*.

3. REACTIVOS Y OTROS PRODUCTOS

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por las casas comerciales Difco, Pronadisa, Sigma, Roche, Merck y Becton Dickinson. La agarosa fue suministrada por Pronadisa. La solución de 40% acrilamida:bisacrilamida (77.5:1; 2.6%) se adquirió a los Laboratorios Bio-Rad. Amersham suministró el cloruro de [*metil*- ^3H] colina. La catalasa fue suministrada por la casa Boehringer Mannheim y la proteinasa K por Roche.

De Sigma-Aldrich se emplearon la BSA que se preparó al 4% en agua a pH 7.5, RNasa, DNasa, Amp, Tc, Kan, estreptomocina (Str), Cm, Ery y Spc. También las en-

zimas que hidrolizan polisacáridos y los diferentes azúcares usados en el capítulo 3 fueron suministradas por Sigma-Aldrich, al igual que el xilitol, la *N*-acetil-L-cisteína (NAC), el ácido zaragóxico A y los inhibidores de serín proteasas benzamidina (BZA) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

El péptido estimulador de la competencia, CSP1, de 17 aminoácidos (EMRLSKFFRDFILQRKK) fue sintetizado por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). La dispersina B (DispB) fue suministrada por Kane Biotech Inc. y por el Prof. Íñigo Lasa (Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra, Pamplona), el metaperyodato sódico por Fluka Biochemika y la Ln por Pfizer.

Las enzimas de *S. pneumoniae* endo- β -*N*-acetilglucosaminidasa D (EndoD), la neuraminidasa A (NanA) y la endo- α -*N*-acetilgalactosaminidasa (*O*-glicosidasa) se obtuvieron de Sigma-Aldrich y la NAM-amidasa procedente de *S. mitis* SK137 (SkI) fue suministrada por el Dr. D. Llull (Llull *et al.*, 2006b). La CbpF fue purificada por M. Morales (Molina *et al.*, 2009),

Los fluorocromos, lectinas y anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Fluorocromos, lectinas y anticuerpos utilizados

Compuesto	Descripción ^a	Excitación/ Emisión (nm)	Fabricante ^b
Anticuerpo secundario-A	anti-oveja/cabra IgG:DYLIGHT 649 (burro)	652/672	AbD
Anticuerpo secundario-B	anti-conejo:Alexa 488 (cabra)	495/519	I-M
Anticuerpo secundario-C	anti-ratón:Alexa 488 (cabra)	495/519	I-M
Anticuerpo secundario-D	anti-conejo:Alexa 568 (burro)	578/603	I-M
anti-LytC	Anticuerpo policlonal frente a LytC (conejo)	–	CIB-CSIC
anti-PIA	Anticuerpo policlonal frente a la adhesina polisacáridica intercelular (PIA) de <i>Staphylococcus</i> PIA (conejo)	–	I. Lasa
BacLight	Kit para monitorizar la viabilidad de la población bacteriana en función de la integridad de la membrana celular (SYTO 9/yoduro de propidio)	Viables 480/500 No viables 535/617	I-M
C1q-FITC	anti-C1q humano conjugado con Isotiocianato de fluoresceína FITC (conejo)	495/519	AbD
C3b	anti-C3b humano (cabra)		C
C3b-APC	anti-C3b humano conjugado con Aloficocianina con el kit LYNX RAPID APC ANTIBODY CONJUGATION de AbD serotec (cabra)	633/661	Esta tesis
C3b-FITC	anti-C3b humano conjugado con FITC (cabra)	495/519	CB
C4BP	anti-C4BP humano (oveja)		AbD
Calcoflúor White M2R	Se une a polisacáridos con enlaces β -1,3 y β -1,4	405/410–480	SA
ConA-Alexa flúor 594	Aglutinina de frijol (<i>Canavalia ensiformis</i>) conjugada al Alexa flúor 594. Se une a α -manopiranosil/ α -glucopiranosil	590/617	I-M
CRP	anti-CRP humana (conejo)		C
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol. Se une a ácidos nucleicos. Permeable	358/461	I-M
DDAO	7-hidroxi-9H-(1,3-dicloro-9,9-dimetilacridina-2-ona). No permeable	400/650	I-M
FH	anti-factor H humano (oveja)		AbD
IgA, Kappa (mieloma)	anti-fosforilcolina. Clon TEPC15 (ratón)		SA
PNA-Alexa flúor 594	Aglutinina de cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i>) conjugada al Alexa flúor 594. Se une a residuos terminales de β -galactosa	590/617	I-M
SBA-Alexa flúor 488	Aglutinina de soja (<i>Glycine max</i>) conjugada al Alexa flúor 488. Se une a α y β -N-acetilgalactosamina(GalNAc)/residuos de galactopiranosil	495/519	I-M

SYTO 9	Se une a ácidos nucleicos. Permeable	480/500	I-M
SYTO 59	Se une a ácidos nucleicos. Permeable	622/645	I-M
SYTO 60	Se une a ácidos nucleicos. Permeable	652/678	I-M
WGA-Alexa flúor 488	Aglutinina de germen de trigo (<i>Triticum vulgare</i>) conjugada al Alexa flúor 488. Se une a GINAc/ácido <i>N</i> -acetilneuramínico (Neu5Ac)	495/519	I-M
WGA-Alexa flúor 594	Aglutinina de germen de trigo (<i>Triticum vulgare</i>) conjugada al Alexa flúor 594. Se une a GINAc/Neu5Ac	590/617	I-M
WGA-Alexa flúor 647	Aglutinina de germen de trigo (<i>Triticum vulgare</i>) conjugada al Alexa flúor 647. Se une a GlcNAc/Neu5Ac	650/665	I-M
Yoduro de propidio	Se une a ácidos nucleicos. No permeable	535/617	I-M

^a El origen de los anticuerpos se indica entre paréntesis.

^b AbD, AbD serotec; C, Calbiochem; CB, Cappel (MP Biomedicals); I-M, Invitrogen. Molecular Probes; SA, Sigma-Aldrich.

4. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

E. coli se transformó utilizando el método del RbCl (Hanahan, 1983; Sambrook y Rusell, 2001). Para la transformación de *S. pneumoniae* se prepararon células competentes según dos métodos descritos previamente con ligeras modificaciones (Tomasz, 1970; Martin *et al.*, 1995). Un cultivo exponencial en medio C+Y suplementado con 0.08% de BSA (C+Y+A) se diluyó 40 veces en un volumen final de 10 ml del mismo medio y se incubó hasta alcanzar una A_{550} de 0.18–0.2. Rápidamente se puso el cultivo en hielo, se centrifugó a 5000 rpm utilizando un rotor SS-34 durante 10 min a 4°C y las células se concentraron 10 veces resuspendiéndolas en C+Y+A. Posteriormente, se añadió glicerol a una concentración final del 15% y las células se congelaron rápidamente en una mezcla de nieve carbónica-etanol y se conservaron a –80°C. Para la transformación de *S. pneumoniae* inducida por CSP1, las células competentes (0.1 ml) se incubaron con 0.9 ml de medio CpH8 suplementado con BSA al 0.08% (C+A) en presencia de 100–250 ng ml⁻¹ de CSP1 durante 10 min a 37°C. A continuación, se añadió el ADN donador a un mínimo de 100 µl de células activadas y la mezcla se incubó durante 20 min a 30°C. Se sembraron diluciones apropiadas de la transformación en placas de agar D suplementado con 3% de sangre desfibrinada de carnero y se incubaron durante 2 h a 37°C, para permitir la expresión fenotípica (Moscoso y Claverys, 2004). Posteriormente, los transformantes se seleccionaron añadiendo una segunda capa de agar D con el antibiótico adecuado y las placas se incubaron durante toda la noche a 37°C. En algunos casos, las células pre-competentes se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Martin y cols. (1995) utilizando el medio completo 1 de transformación (CTM 1: medio CAT suplementado con 1 mM CaCl₂ y BSA al 0.2%) y realizando la transformación en medio CTM 2 (medio similar al CTM 1 excepto que el pH se ajustó a 7.9). Algunas veces, la expresión fenotípica se realizó en medio líquido C+Y+A incubando la mezcla de transformación durante 90 min a 37°C y las diluciones correspondientes se sembraron en superficie en placas de agar-sangre con antibiótico o en placas de C+Y+A conteniendo catalasa.

4.1. Obtención de cepas capsuladas de *S. pneumoniae*

Para la obtención de cepas capsuladas se realizó una transformación genética de *S. pneumoniae* no capsulada usando la metodología descrita en el apartado ante-

rior, variando el proceso de selección de transformantes. Esta técnica se basa en el uso del suero anti-R que se une a las bacterias no capsuladas y éstas aglutinan en el fondo del tubo (McCarty *et al.*, 1946; Ravin, 1959). Se emplea como donador el ADN de la cepa capsulada y una vez realizada la expresión fenotípica durante 90 min a 37°C, se pasa toda la mezcla a un nuevo tubo con 2 ml de C+Y+A conteniendo 2 µl de suero anti-R y se incuba a 37°C hasta que se observe la formación de un precipitado celular en el fondo del tubo; a continuación, se retiran 100 µl de la parte superior del tubo que se añaden a un nuevo tubo con C+A y anti-R que se incuba de nuevo a 37°C. Tras sucesivos pases, los transformantes capsulados de neumococo se recuperan de la parte superior del tubo. Posteriormente, se aislan en placa distintas colonias y se comprueba la presencia de CPS y el serotipo correspondiente, utilizando para ello PCR o mediante la reacción capsular (“Quellung”) en el laboratorio de referencia de neumococo en España (Dra. Asunción Fenoll, Centro de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda).

5. TÉCNICAS DE ADN

5.1. Preparación de ADN cromosómico

El ADN cromosómico de *S. pneumoniae* se preparó utilizando un procedimiento descrito previamente con pequeñas modificaciones (Fenoll *et al.*, 1994). Para ello, las células de un cultivo crecido a A_{550} de 0.6–0.7 (10 ml) se sedimentaron por centrifugación a 5000 rpm, utilizando un rotor SS-34 durante 10 min a 4°C. Para los cultivos LytA⁻, las células se resuspendieron en 0.4 ml de tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6.9 (SP) y 25 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Posteriormente, se añadió NAM-amidasa LytA pura (5–10 µg) y se incubó a 37°C durante 15–20 min. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 50 µl de una solución de Doc al 10% y se incubó a 37°C hasta la lisis total del cultivo. A los cultivos lisados se les añadió RNasa (100 µg ml⁻¹) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se trató con proteinasa K (100–200 µg ml⁻¹) durante 1 h a 37°C. Las proteínas restantes se eliminaron mediante un tratamiento con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 12000 × *g* durante 5 min para separar la fase acuosa de la orgánica e interfase (proteínas y contaminantes). Para precipitar el ADN, se pasó la fase acuosa a un tubo limpio y se añadieron 0.1 volúmenes de 3 M acetato potásico, pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo durante 20

min a -20°C y se sedimentó por centrifugación a $12000 \times g$ durante 20 min a 4°C . Para eliminar las sales que podrían haber co-precipitado con el ADN, se realizó un lavado con 500 μl de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a 4°C , 10 min. El ADN sedimentado se dejó secar al aire para la eliminación completa del etanol de la muestra y se resuspendió en tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA). Los ADNs cromosómicos de *Clostridium acetobutylicum*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *E. coli* HB101, *Azoarcus* sp. CIB y *Micrococcus roseus* fueron cedidos amablemente por las Dras. A. Prieto y T. Zamarro del CIB.

5.2. Preparaciones de ADN plasmídico

Para la extracción a partir de *E. coli*, se inoculó la cepa correspondiente en 10 ml de medio LB (con el antibiótico requerido) y se incubó a 37°C en agitación durante 12–16 h hasta que alcanzó una A_{600} de 1.5–5. Posteriormente, se procedió a la purificación del plásmido con el sistema comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante. En ocasiones, el plásmido fue purificado mediante centrifugación isopícnica en gradientes de CsCl-bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989).

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

5.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa al 0.7 o 1.5% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8.1), utilizando el mismo tampón para el desarrollo de la electroforesis. A las muestras se les añadió 1/4 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0.2% (p/v), xilencianol al 0.2% y EDTA 40 mM (pH 8.0). La electroforesis se realizó a 100–150 V durante 60–90 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) o GelRed (Biotium) y los fragmentos de ADN se visualizaron con radiación ultravioleta. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron, según los

casos, el ADN del fago λ digerido con BstEII (Amersham) la forma replicativa del ADN del fago ϕ X174 digerida con HaeIII y el ADN monocatenario de M13mp18 así como los marcadores de 1 kb y de 100 pb en escalera de New England Biolabs.

5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

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

5.5. Secuenciación de ADN

La secuenciación se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo Abi Prism 3700™ (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de Applied Biosystems, y la ADN polimerasa AmpliTaq FS, siguiendo las recomendaciones de los suministradores. Las reacciones se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador *Gene Amp PCR System 2400* de Perkin-Elmer y fue llevada a cabo por Secugen.

5.6. Manipulación del ADN con enzimas de uso común en biología molecular

Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de Takara, Amersham, o New England Biolabs. La ADN ligasa del fago T4 fue adquirida de New England Biolabs o Takara. Las enzimas y sus tampones correspondientes se utilizaron siguiendo, en cada caso, las indicaciones recomendadas por las casas comerciales correspondientes.

5.7. Mutagénesis mariner

5.7.1. Purificación de la transposasa Himar1

La purificación de la transposasa *Himar1* se realizó a partir de un cultivo de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) que contiene el plásmido pET13a/*Himar1* siguiendo el protocolo descrito por Lampe y cols. (1996) con ligeras modificaciones. La inducción de la expresión de la proteína se llevó a cabo con 1 mM de IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalacto-piranosido) durante 2 h a 37°C cuando el cultivo alcanzó una A_{600} igual a 0.6. Las células se recogieron por centrifugación y se concentraron 100 veces en un tampón de resuspensión [MgCl₂, 2 mM; ditioneitol (DTT), 1 mM; benzamidina (BZA), 1 mM; Tris-HCl, 20 mM, pH 7.6]. A continuación, esta suspensión celular se dividió en alícuotas de 1 ml que se congelaron rápidamente en una mezcla de hielo seco y etanol y se guardaron a -80°C hasta su uso posterior. Para la purificación, se descongeló en hielo una de estas alícuotas y las células se lisaron con 0.25 mg de lisozima en tampón de lisis [NaCl, 0.2 M; EDTA, 4 mM; 1% Doc; 1% NP-40; DTT, 1 mM; fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 0.6 mM; BZA, 1 mM; Tris-HCl, 20 mM, pH 7.6] y se trataron con 60 μ g de DNasa I. Como la transposasa *Himar1* se expresa exclusivamente formando cuerpos de inclusión, el lisado celular se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el sedimento que contiene los cuerpos de inclusión se lavó 3 veces con 1 ml de tampón de lavado (0.5% NP-40, 1 mM EDTA) y dos veces más con 1 ml de tampón de lavado y 1 ml de 6 M urea. Los cuerpos de inclusión se resuspendieron en tampón de columna (Guanidina/HCl, 4 M; NaCl, 50 mM; DTT, 5 mM; BZA, 1 mM; PMSF, 1 mM; Tris-HCl, 20 mM, pH 7.6) y se pasaron por una columna de DEAE-Sephacel pre-equilibrada con el mismo tampón a 4°C. Las fracciones que contenían una mayor concentración de la transposasa se dializaron 3 veces frente a 1 l de tampón de renaturalización (NaCl, 0.1 M; MgCl₂, 10 mM; DTT, 1 mM; Tris-HCl, 50 mM, pH 7.6) y las muestras se guardaron a -80°C con glicerol al 50%.

5.7.2. Mutagénesis

La mutagénesis *mariner* se basa en una reacción de transposición *in vitro* mediada por la transposasa *Himar1*, que sólo requiere la presencia del dinucleótido TA en la secuencia diana. La reacción se realiza utilizando minitransposones con repeticiones

invertidas que reconoce la transposasa *Himar1* flanqueando genes marcadores que se expresan en neumococo y usando ADN cromosómico (o fragmentos de PCR con el gen de interés) de *S. pneumoniae* R6 (o M32) como sustrato. Los productos de la reacción de transposición *in vitro* se introdujeron mediante transformación genética en *S. pneumoniae* y los transformantes se seleccionaron en placa por resistencia al antibiótico correspondiente. La identificación del gen interrumpido se hizo utilizando PCR inversa, PCR arbitraria o PCR con un solo oligonucleótido. La PCR inversa es una forma clásica de amplificar ADN flanqueante de una secuencia conocida de ADN (Triglia *et al.*, 1988). El proceso de PCR inversa implica digestión del ADN, circularización intramolecular de los fragmentos lineales y la amplificación del ADN circular de doble cadena. La digestión de entre 3 y 6 μg de ADN se realizó con las enzimas *MunI*, *PvuII* o *XmnI* que reconocen secuencias localizadas fuera de la región flanqueada por las IRs que lleva el marcador de resistencia utilizado para realizar la mutagénesis *mariner*. Como control positivo se usó el ADN de una cepa que llevaba insertado en su genoma el transposón y, como control negativo, el ADN de R6 o M32, según la genoteca. A continuación, se realizó la ligación intramolecular de los fragmentos digeridos usando la ADN ligasa del fago T4 durante 24 horas a 16°C y se purificó con *GeneClean Turbo Kit* (MP Biomedicals). Por último, se realizó una PCR convencional usando los oligonucleótidos MP127 y MP128, que se unen a las IRs del transposón y a una región adyacente de la IRL, respectivamente, se purificó la banda de PCR con *GeneClean Turbo Kit* (MP Biomedicals) y se secuenció para determinar el punto de inserción del transposón.

La PCR arbitraria es otra técnica para amplificar ADN flanqueante de una secuencia conocida de ADN (O'Toole *et al.*, 1999). Esta metodología se basa en el uso de oligonucleótidos específicos para el extremo del transposón y oligonucleótidos que contienen una secuencia interna inespecífica, que puede anillar con el ADN cromosómico próximo a la inserción de aquel. En la primera PCR se usaron los oligonucleótidos ARB1 y MP129 (o MP130) y, en la segunda, ARB2 y MP128 (o MP131) que se localizan más internamente que los anteriores. Posteriormente, se purificó la banda de PCR con *GeneClean Turbo Kit* (MP Biomedicals) y se secuenció.

Otra de las variantes de la PCR convencional que se usaron para identificar los sitios de inserción del transposón es la PCR con un solo oligonucleótido que consiste, como indica su nombre, en realizar una PCR usando un solo oligonucleótido (Karlyshev *et al.*, 2000; Prudhomme *et al.*, 2007); éste es específico del transposón

usado para realizar la mutagénesis y, en nuestro caso, utilizamos el oligonucleotido MP128.

5.8. Construcción de mutantes de inserción por recombinación homóloga

Se construyó un mutante de inserción en cada uno de los genes *spr0091* y *spr0092* de *S. pneumoniae* R6. Se amplificó una región interna de las secuencias de estos genes mediante PCR y los productos correspondientes se insertaron en pUCSpc previamente digerido con BamHI y HindIII. El plásmido pUCSpc es un vector no replicativo en *S. pneumoniae* que confiere resistencia a espectinomicina. Se transformó *E. coli* DH5 α con las ligaciones del fragmento del gen correspondiente y el plásmido digerido y los transformantes se seleccionaron en placas de LB-agar conteniendo 0.5 mM IPTG, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) (40 μ g ml⁻¹) y Spc (100 μ g ml⁻¹). Se seleccionaron los clones por resistencia a Spc y el color blanco de sus colonias, ya que si la ligación fue correcta la expresión del producto del gen *lacZ* que lleva este plásmido queda truncada y no hay expresión de β -galactosidasa. Una vez obtenidos los plásmidos pUCSpc-*spr0091* y pUCSpc-*spr0092* de *E. coli* DH5 α se transformó con ellos *S. pneumoniae* R6 y se seleccionaron los clones por resistencia a Spc. La correcta interrupción génica de los mutantes seleccionados se comprobó mediante amplificación por PCR.

6. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS

6.1. Expresión y purificación de enzimas líticas

Para la purificación de las CBPs capaces de degradar las paredes celulares de neumococo (véase apartado 1.6 de la Introducción), se siguió el protocolo descrito previamente para la NAM-amidasa LytA (García *et al.*, 1987a). Brevemente, un cultivo de *E. coli* RB791 (pGL100) (Tabla 5) se inoculó en medio LB suplementado con Amp (100 μ g ml⁻¹) y 2% de lactosa y se incubó a 37°C con agitación durante toda la noche. Posteriormente, el cultivo se dejó en hielo durante 15 min y las células se recogieron por sedimentación a 10000 \times g durante 10 min a 4°C, se lavaron con tampón SP y se resuspendieron en 10 ml del mismo tampón. La lisis celular se realizó pasando la suspensión por una prensa de French a una presión de 8.3 MPa y se descartaron los restos celulares con una centrifugación a 3000 \times g durante 10

min a 4°C. Los extractos celulares se mantuvieron en hielo y se pasaron por una columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con tampón SP. La columna se lavó con el mismo tampón suplementado con 1 M NaCl para eluir las proteínas que no tienen afinidad por DEAE. La proteína LytA se eluyó con el mismo tampón conteniendo 1 M NaCl y 2% de cloruro de colina. Posteriormente, se comprobó la actividad de la enzima y se verificó la pureza de la misma mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) (12%).

En el caso de la purificación de la lisozima LytC se siguió el protocolo descrito por García y cols. (1999a). Para ello, la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pLCC14 (Tabla 5), se incubó en medio LB suplementado con Amp (100 µg ml⁻¹) en agitación a 37°C hasta alcanzar una A₆₀₀ igual a 0.5. En este punto se realizó la inducción de la expresión del gen *lytC* mediante la adición de 40 µM de IPTG y el cultivo inducido se incubó durante 3 h a 22°C para disminuir la presencia de cuerpos de inclusión. El cultivo se centrifugó a 10000 × g durante 5 min a 4°C y las células se resuspendieron en tampón SP pH 6.0. La lisis celular se realizó pasando la suspensión por una prensa de French a una presión de 8.3 MPa y se descartaron los restos celulares con una centrifugación a 15000 × g durante 15 min a 4°C. Los extractos celulares se mantuvieron en hielo y se pasaron por una columna de DEAE-celulosa previamente equilibrada con tampón SP pH 6.0. A partir de aquí, se siguió el protocolo descrito anteriormente para la NAM-amidasa LytA aunque utilizando una concentración de cloruro de colina al 4% en el tampón de elución. La proteína LytB se purificó siguiendo un protocolo similar, salvo que la inducción del cultivo se realizó con 50 µM de IPTG cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria (A₆₀₀ = 0.8) y se continuó la incubación durante 6 h a 25°C (De las Rivas *et al.*, 2002).

Para la purificación de las enzimas fágicas se siguió la metodología previamente descrita: Ejl (Díaz *et al.*, 1992), Pal (Sheehan *et al.*, 1997) y Cpl-1 (Sanz y García, 1990). Para purificar la lisozima Cpl-7, la única peptidoglicán hidrolasa del sistema de neumococo y sus fagos que posee una actividad independiente de la presencia de residuos de colina en los TAs (véase apartado 1.6 de la Introducción), se utilizó el método descrito recientemente por Bustamante *et al.* (2010). En esquema, los lisados de *E. coli* conteniendo el plásmido pCP700 (Tabla 5), se precipitaron selectivamente con cantidades crecientes de sulfato amónico y las proteínas precipitadas entre el 20 y el 35% (p/v) de saturación fueron dializadas y sometidas a cromatografía en una columna de DEAE-celulosa que fue tratada con concentraciones crecientes de NaCl. La lisozima Cpl-7 eluyó a una concentración de NaCl de 0.46 M.

6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

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

7. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

7.1. Aislamiento y purificación de paredes radiactivas

Para el aislamiento de las paredes celulares de *S. pneumoniae*, se siguió un método desarrollado previamente (García-Bustos y Tomasz, 1987). Se cultivó la cepa R6 en medio CpH8 en presencia de cloruro de [metil-³H]colina (60 Ci/mmol; Amersham) (Mosser y Tomasz, 1970), hasta que el cultivo alcanzó una concentración celular aproximada de 4×10^8 UFC ml⁻¹. Las células se centrifugaron a $3000 \times g$ durante 10 min a 4°C y el precipitado resultante se resuspendió en tampón fosfato-salino (20 mM SP, pH 7.0; 0.15 M NaCl). Posteriormente, la suspensión celular se calentó a 90°C durante 30 min en presencia de SDS al 4% (p/v) con el fin de inactivar las autolisinas. Después de varios lavados con agua destilada para eliminar el detergente, las células se rompieron mediante el uso de una prensa de French. Finalmente, las paredes se resuspendieron en tampón SPSH (tampón SP 25 mM, pH 8.0; β-mercaptoetanol, 20 mM y NaCl 0.15 M) para que 10 μl correspondieran a, aproximadamente, 5000–7000 cuentas por minuto (cpm).

7.2. Ensayo de actividad enzimática

El ensayo cuantitativo de la actividad hidrolítica de LytA, LytC, Pal, Ejl, Cpl-1 y Cpl-7 sobre paredes de neumococo siguió la técnica descrita por Høltje y Tomasz (1976). A menos que se indique otra cosa, la mezcla de reacción contiene 10 μl de paredes de neumococo marcadas radiactivamente con [metil- ^3H] colina y de 5 a 50 μl de la dilución adecuada del extracto celular o de la enzima purificada ajustando a un volumen final de 250 μl con tampón SP a pH óptimo para cada enzima. La mezcla se incuba a 37°C (en el caso de LytC a 30°C) durante 10–20 min y se detiene la reacción con la adición de 10 μl de BSA (4%) y 10 μl de formaldehído al 35%. La muestra se centrifuga a 12000 $\times g$ durante 15 min y se recogen 200 μl del sobrenadante, al que se añade líquido de centelleo para determinar la radiactividad liberada. Una unidad (U) de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1 μg de paredes (aproximadamente 700 cpm netas) en 10 minutos.

8. EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR DE SEROTIPO 3

El CPS de serotipo 3 fue adquirido de la *American Type Culture Collection* (ATCC) o se purificó en el laboratorio según el método descrito por Lund y Henrichsen (1978). Se parte de un cultivo de *S. pneumoniae* en medio CpH8 y en fase estacionaria al que se añade 1% de Doc (concentración final) y se incuba a 37°C durante 30 minutos para permitir la lisis del cultivo. Si las cepas de neumococo son mutantes *lytA* se añade LytA (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) durante 30 min a 37°C antes de la adición de Doc. El lisado se acidifica con ácido acético (0.5% concentración final) y se calienta a ebullición. Después de enfriar, la mezcla se neutraliza con NaOH y se desproteíniza con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El polisacárido se precipita por la adición de dos volúmenes de etanol absoluto frío. Después de reposar durante la noche a 4°C, el precipitado se recupera por centrifugación (10000 $\times g$, 30 min), se lava una vez con etanol al 96%, dos veces con éter dietílico y se seca a 65°C. El polisacárido se disuelve en agua destilada.

El CPS de neumococo tipo 3 está compuesto por el ácido celobiurónico, que es un disacárido formado por la unión β (1 \rightarrow 4) del ácido D-glucurónico a la D-glucosa. El método para la cuantificación del ácido urónico se basa en la aparición de un cro-

cromógeno cuando el ácido urónico se calienta a 100°C en una solución de ácido sulfúrico/tetraborato y se trata después con *m*-hidroxidifenil (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).

9. BIOFILMES

9.1. Formación de biofilmes en placas multipocillo

Las condiciones óptimas para el crecimiento en biofilm de *S. pneumoniae* sobre superficies abióticas se han descrito previamente (Moscoso *et al.*, 2006). Para la formación del biofilm se usaron placas multipocillo de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Costar 3595; Corning Incorporated). La cuantificación del biofilm se llevó a cabo usando un protocolo modificado del descrito previamente por O'Toole y Kolter (1998). Brevemente, los cultivos de *S. pneumoniae* R6 se incubaron en medio C+Y a 37°C hasta una A_{550} de 0.5–0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 10, 100, 1000 o 2000 veces en medio CpH8. A continuación, las placas se inocularon con 200 μ l por pocillo (4.5×10^6 UFC/pocillo en el caso de la dilución 1/100) y por triplicado y se incubaron durante 6, 14 o 16 h a 34°C, dependiendo de la dilución y las cepas empleadas. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la A_{595} utilizando un lector de placas (Microplate Absorbance Reader 2020; Anthos Labtec Instruments GmbH). Bajo estas condiciones, aproximadamente 2.4×10^8 UFC ml^{-1} y 1.5×10^8 UFC ml^{-1} crecen como cultivo planctónico y sésil, respectivamente. Posteriormente, se procesó el biofilm tiñendo cada pocillo con 50 μ l de una solución de cristal violeta al 1% (CV) y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Después, se lavó cada pocillo 3 veces con 200 μ l de agua destilada y se dejó secar al aire. La formación de biofilm teñido con CV se cuantificó solubilizando éste con 200 μ l de etanol al 96% y midiendo la A_{595} .

Para los biofilmes de *S. aureus* y *S. epidermidis*, las bacterias se incubaron en medio TSBGY a 37°C en agitación hasta una A_{550} de 0.5–0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en medio TSBGY. A continuación, las placas se inocularon con 200 μ l por pocillo y por triplicado, y se incubaron durante 20 h a 37°C.

9.1.1. Ensayos de inhibición y disgregación del biofilm

Los ensayos de inhibición consisten en añadir desde el principio el compuesto a ensayar junto con el inóculo bacteriano. Una vez finalizado el tiempo de incubación a 34°C se procesó el biofilm como se describe en el apartado 9.1.

Los ensayos de disgregación de los biofilmes se llevaron a cabo de la siguiente manera: una vez formado el biofilm como se describe en el apartado 9.1, se realizó una medida control del crecimiento (A_{595}), se retiró el cultivo planctónico y las células adheridas se lavaron con medio CpH8 o tampón SP (pH 7.0). A continuación, se añadió el tampón control SP a pH 7.0 o el tampón óptimo para el compuesto a probar, hasta un volumen final de 200 μ l por pocillo. Se realizó una nueva lectura del crecimiento a A_{595} y se incubó a la temperatura y tiempo adecuados dependiendo del compuesto o enzima a probar. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron 50 μ l de CV al 1% por pocillo y se procesó como se describe en el apartado anterior.

9.2. Microscopía láser confocal

La microscopía láser confocal (CLSM) fue muy utilizada en esta tesis para observar la arquitectura de los biofilmes. Para ello se inocularon 2 ml de los cultivos bacterianos en placas con fondo de vidrio (WillCo-dish; WillCo Wells B. V., Holanda) y se incubaron el tiempo y temperatura correspondiente a cada bacteria. En el caso de *S. pneumoniae* R6 se utilizaron las condiciones descritas previamente (Moscoso *et al.*, 2006). A continuación, los biofilmes se trataron (o no) con distintos compuestos para ver su efecto. El medio de cultivo se retiró y el biofilm se lavó con tampón SM (NaCl, 100 mM; MgSO₄, 8 mM; Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5) y se tiñeron con el fluorocromo, la lectina o el compuesto o *kit* correspondiente. Los biofilmes se observaron utilizando los microscopios Leica TCS-SP2-AOBS-UV CLSM y TCS-SP5-AOBS-UV CLSM y los objetivos 100 \times y 63 \times , respectivamente. Las imágenes se analizaron mediante el *software* de Leica LCS. Se obtuvieron las proyecciones de los planos x-y (imágenes individuales a intervalos de 0.5 μ m) y x-z (imágenes a intervalos de 3 y 5 μ m).

9.3. Microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas

La microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas (LTSEM) fue útil para el estudio de la organización en vivo de las bacterias que forman el biofilm, evitando los posibles artefactos debidos a la fijación, deshidratación y secado. Con esta técnica se puede visualizar el espacio ocupado por el agua y las bacterias pueden ser examinadas sin sufrir tratamientos invasivos que puedan perturbar la organización del biofilm. Los biofilmes de *S. pneumoniae* se formaron sobre cubreobjetos de vidrio de 14 mm, incluidos en una placa multipocillo de 24 pocillos. Una vez formado el biofilm se retiró el cultivo planctónico, se fracturó mecánicamente el cubreobjetos y se incluyó uno de los trozos en un sistema de criotransferencia que se sumergió en nitrógeno líquido. Posteriormente, la muestra se congeló y criofracturó y, después de la sublimación del hielo, la muestra se recubrió de partículas de oro observándose en el microscopio electrónico de barrido DSM 960 Zeiss a -135°C (Servicio de Microscopía Electrónica, Centro de Ciencias Medioambientales, CCMA-CSIC).

9.4. Extracción, purificación y análisis del polisacárido extracelular de la matriz del biofilm

La extracción del polisacárido extracelular de la matriz del biofilm de *S. pneumoniae* se realizó con la cepa R6. Se partió de un litro de cultivo de *S. pneumoniae* R6 tanto para el cultivo planctónico (muestra P; planctónico) como para el biofilm. El biofilm se formó en placas Petri convencionales. Ambas muestras se incubaron 6 h a 34°C partiendo del mismo pre-inóculo. Una vez formado el biofilm, se separó, por un lado, el cultivo planctónico de ese biofilm (fracción denominada BP; biofilm-planctónico) y, por el otro, se resuspendió el biofilm con tampón SP pH 7.0 estéril (fracción denominada B; biofilm). Cada una de las tres muestras (P, BP y B) fue tratada de la misma manera. La extracción del polisacárido extracelular se realizó con NaOH (1 N, concentración final) durante 24 h a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se centrifugaron a 6000 rpm (rotor GS3) durante 40 min a temperatura ambiente. Los diferentes sedimentos obtenidos se resuspendieron en agua destilada estéril y las muestras se dializaron exhaustivamente contra agua destilada usando membranas que excluyen las moléculas de más de 3.5 kDa (SnakeSkinTM Pleted

Dialysis Tubing; Thermo Scientific). Posteriormente, las muestras se congelaron a -80°C y, finalmente, se liofilizaron para su posterior análisis.

9.4.1. Determinación de la composición de monosacáridos del exopolisacárido

Con el fin de determinar la composición de un polisacárido es necesario, en primer lugar, despolimerizarlo y, para ello, se recurre a la hidrólisis ácida de las muestras (Prieto, 1992). En experimentos preliminares se utilizó ácido trifluoroacético a diferentes concentraciones pero no se consiguió un rendimiento apreciable. En consecuencia, se utilizó la denominada hidrólisis Saeman (Adams, 1965) que consiste en añadir a la muestra H_2SO_4 concentrado (72%), dejarlo actuar durante 1 h a temperatura ambiente y, después de diluirlo hasta 1 M, la mezcla se mantuvo en estufa a 100°C durante 3 h. El exceso de H_2SO_4 se neutralizó con BaCO_3 . Después de hidrolizar cada muestra, se añadió inositol (50 μg) como patrón interno y se procedió a la eliminación del residuo insoluble de BaSO_4 .

Los monosacáridos son moléculas no volátiles y, por ello, es necesario derivatizarlos para su posterior identificación por cromatografía de gases. En el presente trabajo se han obtenido acetatos de alditol, que producen un único derivado de cada monosacárido dando lugar a cromatogramas relativamente sencillos. La preparación de acetatos de alditol se llevó a cabo según la metodología descrita por Laine y cols. (1972) que incluye una reducción de los monosacáridos liberados por la hidrólisis ácida con NaBH_4 . Los azúcares neutros fueron identificados y cuantificados mediante cromatografía de gases. En el momento del análisis, las muestras se disolvieron en 200 μl de cloroformo y se tomó una alícuota de 1 μl que fue inyectada en el cromatógrafo. El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un instrumento CG-EM 7980A-5975C (Agilent), equipado con una columna HP-5MS (30 m \times 0.25 mm; espesor de la película de la fase estacionaria, 0.2 μm), un inyector *split/splitless* y con helio (0.6 ml min^{-1}) como gas portador. Inyector y detector se programaron a una temperatura de 250°C y, para la separación de los monosacáridos, se empleó un programa de temperaturas que comienza isotérmicamente a 190°C (2 min), aplicando a continuación una rampa de temperatura de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta una temperatura final de 225°C . El pico de cada azúcar en el cromatograma se identificó comparando su tiempo de retención con los de patrones analizados en idénticas condiciones. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos y a los factores de respuesta obtenidos con diferentes monosacáridos patrón.

9.4.2. Determinación de la estructura de los carbohidratos del exopolisacárido de la matriz del biofilm

El análisis de metilación es uno de los métodos más comúnmente empleados para determinar la estructura de los carbohidratos. Consiste en la permetilación del polímero, seguida de su hidrólisis, reducción y acetilación. Los derivados obtenidos, denominados acetatos de alditol parcialmente metilados, son separados por cromatografía de gases e identificados mediante espectrometría de masas en función de sus tiempos de retención y espectros de fragmentación. Por este procedimiento se pueden deducir los tipos de enlaces interglucosídicos existentes en el polisacárido (Jansson *et al.*, 1976). En esta Tesis se utilizó el método de Needs y Selvendran (1993). El polisacárido (1–3 mg) se disolvió en 1 ml de dimetilsulfóxido tras 12 h de tratamiento en un baño ultrasónico seguido de 48 h de agitación en un agitador a 28°C. A continuación, se añadió NaOH pulverizada, sonicando durante 25 min y se enfrió el tubo, añadiendo a continuación 1 ml de yoduro de metilo. La mezcla de reacción se sonicó durante 2 h en baño de ultrasonidos. Los productos de la reacción, recogidos con 2 ml de cloroformo:metanol (1:1), se dializaron frente a agua durante 48 h, posteriormente frente a etanol:agua (1:1) durante 36 h y, finalmente, se evaporaron a sequedad. El polisacárido metilado se hidrolizó para obtener monosacáridos parcialmente metilados que se derivatizaron para dar lugar a sus correspondientes acetatos de alditol parcialmente metilados utilizando la metodología descrita más arriba. Los acetatos de alditol parcialmente metilados se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas en un instrumento Agilent 7980A-5975C equipado con una columna HP-5MS (30 m × 0.25 mm; espesor de la película de la fase estacionaria, 0.2 µm), con helio (15 psi) como gas portador y aplicando el siguiente programa de temperatura: 170°C (1 min), rampa de 2°C min⁻¹ hasta 210°C (1 min). El inyector y la línea de transferencia se mantuvieron a 250°C durante el análisis. La relación de *split* durante la inyección fue de 50:1. Cada uno de los picos del cromatograma se identificó mediante su tiempo de retención y su espectro de masas. La cuantificación se realizó atendiendo al área de los picos.

El análisis de los polisacáridos de la matriz de los biofilmes de neumococo fue llevado a cabo por la Dra. Alicia Prieto (Dpto. de Biología Medioambiental, CIB-CSIC).

10. ENSAYOS DE DEPOSICIÓN DE MOLÉCULAS DEL COMPLEMENTO Y OPSONOFAGOCITOSIS

10.1. Ensayos de deposición del complemento

Para el análisis del depósito de las distintas moléculas del complemento se siguió el método descrito por Brown y cols. (2002) utilizando citometría de flujo, con unas pequeñas modificaciones. Para ello, se realizó un cultivo de *S. pneumoniae* R6 en medio C+Y a 37°C hasta una A_{550} de 0.5–0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en medio CpH8; una dilución se utilizó para cultivo planctónico y otra para inocular 200 μ l por pocillo en una placa de 96 pocillos y permitir la formación del biofilm (4.5×10^6 UFC/pocillo). Ambos cultivos se incubaron durante 5 h a 34°C. Una vez finalizado el tiempo de incubación, el cultivo planctónico se concentró 4 veces y se resuspendió en tampón SP a pH 7.0. Para el procesamiento del biofilm, se retiró el cultivo planctónico, las células del biofilm se lavaron con medio CpH8 y se resuspendieron en 20 μ l de tampón SP pH 7.0 por pocillo con una punta de pipeta y agitación suave en *vortex*. Para el depósito se usaron 20 μ l del biofilm y 20 μ l del cultivo planctónico concentrado. Los experimentos se realizaron por quintuplicado. Se añadieron 10 μ l de suero humano diluido a la mitad en tampón SP pH 7.0 y las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugaron a $12000 \times g$ a 4°C durante 10 min y el sedimento se lavó con 300 μ l de tampón SP pH 7.0-Tween 20 (0.1%). Se añadieron 50 μ l del anticuerpo primario o del ya conjugado. La dilución de este último fue de 1/500, en el caso del C3b-FITC, y de 1/300 para el resto de anticuerpos. El tiempo de incubación fue de 30 min en hielo y oscuridad para el depósito de C3b-FITC, de 2 h en oscuridad a 37°C para C1q-FITC y de 1 h para los anticuerpos primarios a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó y se lavó como en los pasos anteriores. En los casos en que fue necesario utilizar un anticuerpo secundario, se añadieron 50 μ l del anticuerpo y se incubó 30 min a 4°C en oscuridad. Cumplido el tiempo de incubación, se centrifugó y lavó de nuevo. Finalmente, los sedimentos se resuspendieron en una solución al 3% de paraformaldehído y se completó el volumen hasta 250 μ l con tampón SP pH 7.0. Las muestras se analizaron en los citómetros FC 500 (Beckman Coulter) y FACS Calibur (Becton Dickinson).

10.2. Opsonofagocitosis

Para evaluar la susceptibilidad de los biofilmes de neumococo a la opsonofagocitosis, se determinó la proporción de fagocitosis de neumococo mediada por neutrófilos polimorfonucleares humanos. Para ello se utilizó la línea celular humana HL-60 diferenciada a granulocitos (Martínez *et al.*, 1999). Se siguió el protocolo descrito por Romero-Steiner y cols. (1997), con algunas modificaciones. Para ello, se cultivó la cepa *S. pneumoniae* P040 (que expresa la proteína con fluorescencia verde o GFP) en medio C+Y con maltosa al 1% y Tc ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) a 37°C hasta una A_{550} de 0.5–0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en medio fresco por duplicado; una dilución se utilizó para cultivo planctónico y otra para inocular $200 \mu\text{l}$ por pocillo en una placa multipocillo con fondo plano y permitir la formación del biofilm. Ambos cultivos se incubaron durante 5 h a 34°C . Después, el cultivo planctónico se concentró 4 veces y se resuspendió en tampón SP a pH 7.0. Para el procesamiento del biofilm, se retiró el cultivo planctónico, las células del biofilm se lavaron y resuspendieron en $20 \mu\text{l}$ de tampón SP (pH 7.0) por pocillo con una punta de pipeta y agitación suave en vortex. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las bacterias (4×10^8 UFC/pocillo) se opsonizaron con suero humano diluido 1/5 durante 20 min a 37°C . Después, las bacterias opsonizadas, se incubaron con las células HL-60 (10^5 células) durante 1 h a 37°C en la placa multipocillo con fondo redondo (Costar 3799; Corning Incorporated). Se fijaron las muestras con una solución al 3% de paraformaldehído y se completó el volumen hasta $250 \mu\text{l}$ con tampón SP pH 7.0. Las muestras se analizaron en el citómetro FC 500 (Beckman Coulter).

11. MISCELÁNEA

Para el análisis bioinformático se utilizaron programas accesibles a través de Internet como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), SIGNALP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), PFAM (<http://pfam.janelia.org/>) y otros. La determinación del ST mediante la técnica de MLST se llevó a cabo como se describe en <http://spneumoniae.mlst.net/> (Enright y Spratt, 1999). Para la observación del ADN y de los complejos LytC-pGL30, las muestras se prepararon por la Dra. M. T. Rejas (Centro de Biología Molecular, CSIC), siguiendo un procedimiento ya publicado (Sogo *et al.*, 1976).

IV. RESULTADOS

1. BÚSQUEDA DE GENES IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DE BIOFILM DE *S. PNEUMONIAE*

1.1. *Mutagénesis mariner*

Como un primer paso para tratar de comprender las bases genéticas de la formación de biofilmes en *S. pneumoniae*, se aislaron y caracterizaron mutantes de neumococo con una capacidad estadísticamente diferente (mayor o menor) ($P < 0.05$) de formación de biofilmes que la original. Para ello se construyeron dos genotecas, una con la cepa *S. pneumoniae* R6 y otra en la cepa *S. pneumoniae* M32 (Δ lytA32) (un mutante *lytA* descendiente de R6; Tabla 3) mediante mutagénesis al azar mediada por transposón (mutagénesis *mariner*). La principal razón para utilizar la estirpe M32 es que los experimentos de formación de biofilmes pueden ser mejor controlados debido a la ausencia de autólisis en estos cultivos. No obstante, hay que señalar que está bien documentado que los mutantes *lytA* de neumococo sufren una reducción de, aproximadamente, un 20% en la formación de biofilmes con respecto a la cepa progenitora LytA⁺ (Moscoso *et al.*, 2006).

Los mutantes se seleccionaron por su resistencia al antibiótico correspondiente. A continuación, se ensayó, de manera individual, el crecimiento en medio líquido de los diferentes mutantes así como la capacidad de los mismos de formar biofilmes sobre superficies abióticas como el poliestireno o el vidrio. La identificación de los distintos mutantes se realizó empleando las técnicas de PCR inversa, arbitraria o con un sólo oligonucleótido, tal como se ha detallado en el apartado 5.8 de Materiales y Métodos. Dado que se conoce la secuencia genómica completa de la cepa *S. pneumoniae* R6, los genes correspondientes son identificados por comparación con dicha secuencia así como con los de otras estirpes neumocócicas virulentas cuya secuencia genómica es conocida, como son TIGR4 (serotipo 4) y D39 (serotipo 2). En algunos casos, las células del biofilm se tiñeron con el fluorocromo verde SYTO 9 y la arquitectura del biofilm se visualizó mediante el uso de CLSM.

1.1.1. Genoteca de *S. pneumoniae* R6

Esta genoteca se construyó mutagenizando el ADN cromosómico de *S. pneumoniae* R6 con el plásmido pR412 que codifica Spc^R. Se aislaron un total de 248 mutantes que fueron denominados como TRL SpcX, siendo X el número de orden de

RESULTADOS

Tabla 8. Mutantes de *S. pneumoniae* R6 con capacidad de formación de biofilm significativamente diferente a la cepa parental ($P < 0.05$)

Menor producción		Mayor producción	
Mutante TRL Spc	Formación de biofilm (%) ^a	Mutante TRL Spc	Formación de biofilm (%) ^a
1	72.8 ± 2.5	82	142.6 ± 12.3
3	82.1 ± 4.9	85	138.0 ± 6.2
4	76.8 ± 2.8	88	133.9 ± 8.8
5	80.4 ± 5.0	93	133.4 ± 10.7
7	71.0 ± 3.0	105	158.1 ± 5.3
8	74.2 ± 3.2	106	130.0 ± 9.0
9	63.0 ± 2.1	109	134.8 ± 0.8
18	90.1 ± 1.1	111	136.3 ± 4.1
20	87.4 ± 2.8	141	169.4 ± 9.6
25	63.0 ± 2.1	168	153.7 ± 13.8
33	87.4 ± 3.8	171	164.9 ± 23.8
37	86.2 ± 1.3	173	164.8 ± 22.7
41	87.9 ± 5.2	174	191.6 ± 16.1
46	82.7 ± 5.4	175	143.3 ± 13.8
48	85.9 ± 4.4	176	140.6 ± 10.6
50	77.5 ± 2.7	181	137.5 ± 12.0
53	83.8 ± 4.2	185	154.7 ± 9.5
54	84.8 ± 4.2	188	134.1 ± 13.3
55	76.1 ± 1.5	194	157.3 ± 11.0
56	79.6 ± 5.4	197	132.7 ± 3.3
59	80.2 ± 6.7		
66	85.9 ± 1.7		
67	86.3 ± 2.1		
69	80.9 ± 4.5		
70	81.0 ± 6.2		
71	65.8 ± 3.3		
98	57.3 ± 3.8		
133	74.5 ± 7.2		
139	71.1 ± 4.9		
147	77.3 ± 4.8		
150	81.2 ± 2.9		

^a Expresado como la media ± error estándar.

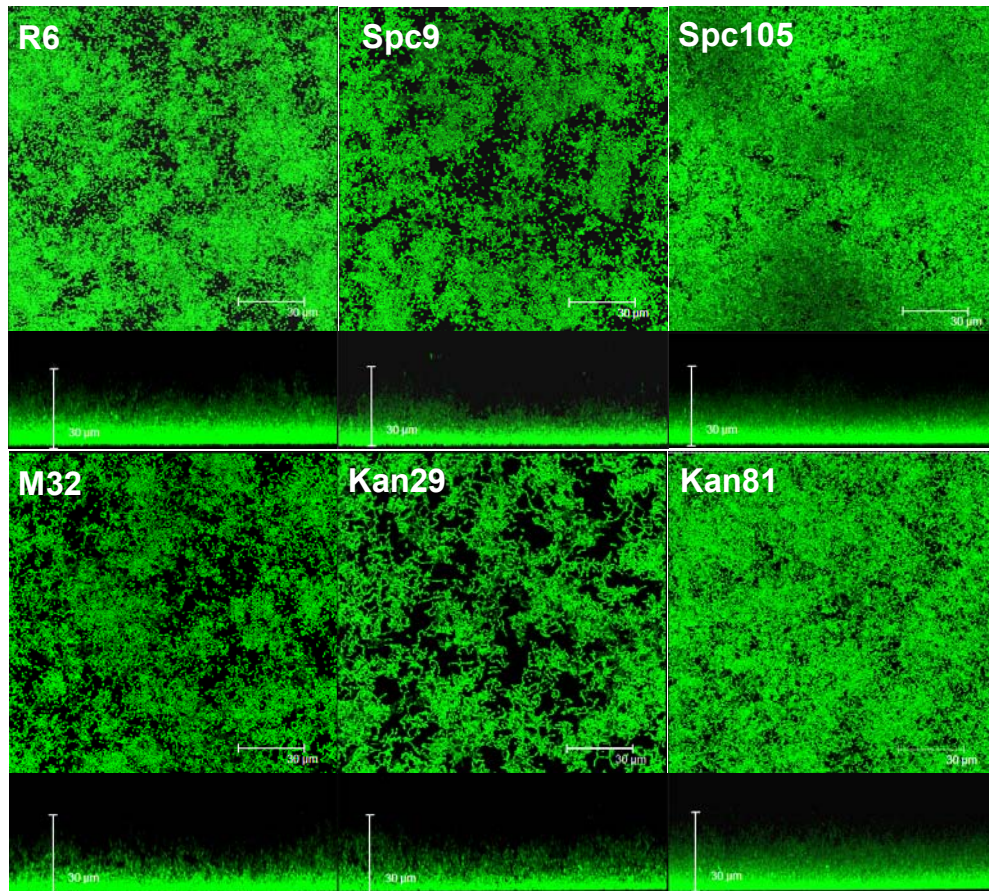


Figura 8. Reconstrucciones tridimensionales horizontales (plano xy) y verticales (plano xz) de diferentes imágenes al CLSM de los biofilmes de algunos mutantes TRL Spc y TRL Kan y los respectivos controles R6 y M32. Estos biofilmes se formaron en placas con fondo de vidrio a 34°C durante 16 h. Las células del biofilm se tiñeron con el *kit* de viabilidad *BacLight*. Barra, 30 μm .

aislamiento del mutante. Cincuenta y un mutantes (20% del total) mostraron una capacidad alterada de formación de biofilm y, de ellos, 31 (61%) formaban menos biofilm que *S. pneumoniae* R6 (Tabla 8). En 15 de los 51 mutantes se determinó dónde había tenido lugar la inserción del transposón (Tabla 9).

1.1.2. Genoteca de *S. pneumoniae* M32

Esta genoteca se construyó mutagenizando el ADN cromosómico de *S. pneumoniae* M32 con el plásmido pR410 que codifica Kan^R. Se obtuvieron 195 mutantes de inserción, denominados como TRL Kan, de los cuales 28 y 10 mostraron una producción de biofilm aumentada o disminuida, respectivamente, con respecto a la cepa M32 ($P < 0.05$) (Tabla 10). En esta genoteca se obtuvo un porcentaje más elevado de clones con capacidad de mostrar un incremento significativo en la formación de biofilm que en la realizada sobre la cepa R6 (73% frente a 39%). En la figura 8 se puede observar la arquitectura del biofilm de dos de estos mutantes y cómo, según la cepa, disminuye (TRL Kan29) o aumenta (TRL Kan81) el espesor, la densidad de su biofilm o ambos, con respecto al formado por la cepa parental M32. La inserción del transposón se determinó en 14 de los 38 mutantes con capacidad alterada de formación de biofilm (Tabla 9).

Para un mayor detalle, la figura 9 muestra un esquema de diferentes zonas del genoma de la cepa R6 con la localización precisa de las diversas inserciones. En dicha figura se representan fragmentos de unas 15–20 kb del genoma con los genes adyacentes a las inserciones para conocer mejor el contexto génico de las mismas. Por otra parte, la figura 10 muestra la secuencia nucleotídica y la posible organización funcional de las siete regiones intergénicas detalladas en la Tabla 9 que contienen insertado algún minitransposón.

1.1.3. Papel biológico de los genes implicados en la síntesis de biofilm

Con objeto de tratar de conseguir más información de la incluida en las bases de datos sobre los genes de *S. pneumoniae* que, de acuerdo con nuestros datos (Tabla 9), están implicados en la formación de biofilmes, se llevó a cabo la búsqueda bibliográfica correspondiente así como diversos análisis bioinformáticos y los resultados de la misma se mencionan a continuación.

Dos primeras consideraciones globales que se pueden destacar son, por un lado, que, con excepción de las inserciones en los genes *spr1651* y *spr1925*, todas las demás inserciones cuya localización ha sido determinada han tenido lugar en genes que, de acuerdo con datos de otros autores (Akerley *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Thanassi *et al.*, 2002; Zalacain *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2005; Bijlsma *et al.*, 2007), no parecen ser esenciales para el crecimiento planctónico en condiciones *in vitro*.

Tabla 9. Localización de la inserción en algunos mutantes de *S. pneumoniae* R6 y M32 con formación de biofilm significativamente diferente a la de la cepa parental

Mutante (TRL_) ^a	Localización de la inserción en ^b			Función predicha ^c
	R6 (<i>spr</i>)	D39 (<i>SPD_</i>)	TIGR4 (<i>SP_</i>)	
Spc93 (↑)	0033	0039	0033	Proteína hipotética conservada
Kan47 (↑)	0065 (<i>galM</i>)–0066	0071 (<i>galM</i>)–0072	0066 (<i>galM</i>)–0073	Aldosa1-epimerasa – Proteína de la familia glioxalasa
Kan43 (↓)	0099	0107	0110	Proteína de membrana
Kan31 (↓)	0148 (<i>dapE</i>)	0152	0150	Peptidasa (familia M20/M25/M40)
Spc66 (↓)	0424 (<i>lacG</i>)	0427 (<i>lacG-1</i>)	0477 (<i>lacG-1</i>)	6-Fosfo-β-galactosidasa
Kan7 (↓)	0450 (<i>hsdR</i>)	0455 (<i>hsdR</i>)	0510 (<i>hsdR</i>)	Sistema de restricción-modificación tipo I, subunidad R
Kan30 (↓)	0506 (<i>bglH</i>)–0507 (<i>pheS</i>)	0503 (<i>bglA-2</i>)– 0504 (<i>pheS</i>)	0578 (<i>bglA-2</i>)– 0579 (<i>pheS</i>)	6-Fosfo-β-glicosidasa – Phe-tRNA sintasa, subunidad α
Spc82 (↑)	0543 (<i>uvrC</i>)	0538 (<i>uvrC</i>)	0618 (<i>uvrC</i>)	Excinucleasa ABC, subunidad C
Spc8 (↓)	0601	0596	0686	Proteína de membrana
Spc25 (↓)	0606–0607	NA–0603	NA–0694	NA – Peptidasa (familia M50)
Spc105 (↑)	0607	0603	0694	Peptidasa (familia M50)
Spc98 (↓)	0711 (<i>dinG</i>)	0705	0802	Exonucleasa (familia DnaQ)/Helicasa (familia DinG)
Spc111 (↑)	0820	0812 (<i>lys1</i>)	0919	Sacaropina deshidrogenasa
Spc18 (↓)	0905 (<i>yfnA</i>)	0887	1001	Proteína de la familia de permeasas de aminoácidos
Spc4 (↓)	0908 (<i>phtE</i>)	0890 (<i>phtE</i>)	1004	Proteína E de la familia de proteínas con triada de histidinas (HxxHxH)
Spc20/50 (↓/↓)	0939	NA	1037	NA
Kan51 (↑)	0945	0924	1043	Proteína hipotética conservada
Kan69 (↑)	0964	0943	NA	Proteína hipotética conservada
Kan81 (↑)	1038	1014	0299	IS630- <i>Spn1</i> (transposasa Orf1)
Kan14 (↓)	1236	1212	1378	Proteína hipotética conservada

Kan29 (↓)	1431 (<i>lytC</i>)	1403 (<i>lytC</i>)	1573 (<i>lytC</i>)	1,4-β- <i>N</i> -acetilmuramidasa
Spc9 (↓)	1519 (<i>glk</i>)	1488	1675	Proteína de la familia ROK
Spc7 (↓)	1611–1612	1576–1577	1785–1786	Proteínas hipotéticas conservadas
Kan18 (↑)	1651	1616	1832	Proteína hipotética conservada
Spc88 (↑)	1762–1763 (<i>plcR</i>)	1744–1745	1945–1946	Lipoproteína – Regulador transcripcional PlcR
Kan42 (↓)	1770 (<i>clyB</i>)	1752	1953	Transportador ABC (secreción de toxinas; permeasa/unión a ATP)
Kan32 (↓)	1828–1829 (<i>nadC</i>)	NA–1826 (<i>nadC</i>)	NA–2016 (<i>nadC</i>)	NA – Nicotinato-nucleótido pirofosforilasa
Kan92 (↑)	1925	1943	2115	Proteína hipotética conservada

^a Las flechas indican aumento (↑) o disminución (↓) de la formación de biofilm.

^b Cuando la inserción es intergénica, se indican los genes flanqueantes. Los números de acceso de los genomas de R6, D39 y TIGR4 son AE007317, CP000410 y AE005672, respectivamente. NA, no anotado.

^c La función predicha corresponde a la anotada en la secuencia genómica de la cepa D39.

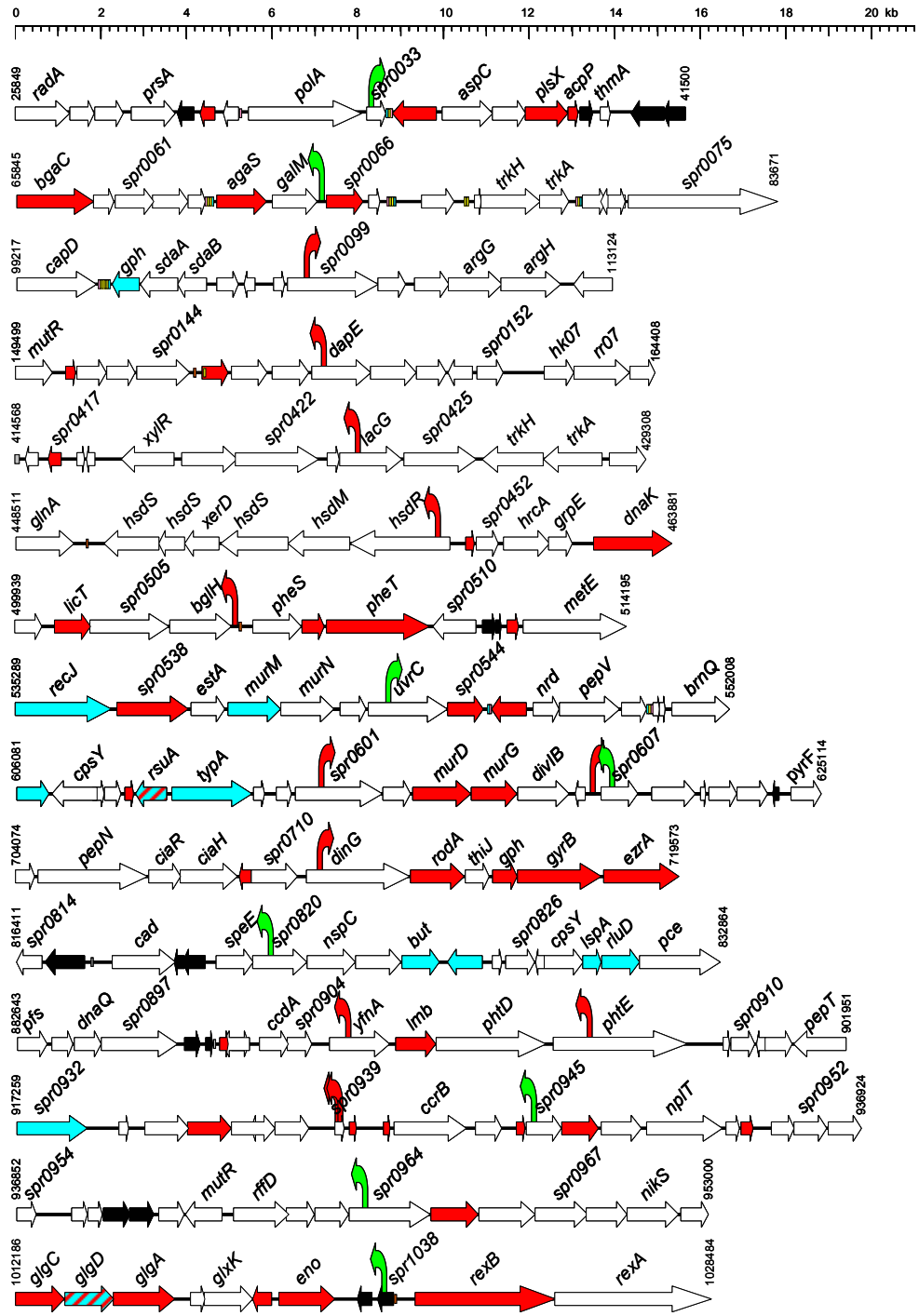
Tabla 10. Mutantes de *S. pneumoniae* M32 con capacidad de formación de biofilm significativamente diferente a la cepa parental

Menor producción		Mayor producción	
TRL Kan	Formación de biofilm (%) ^a	Mutante TRL Kan	Formación de biofilm (%) ^a
7	80.4 ± 10.0	18	130.9 ± 3.0
14	67.8 ± 2.3	47	167.4 ± 2.2
15	68.9 ± 11.4	51	178.9 ± 4.1
29	37.8 ± 10.4	60	149.2 ± 4.0
30	52.1 ± 12.1	64	171.6 ± 21.0
31	72.9 ± 9.4	65	150.4 ± 6.5
32	68.1 ± 2.0	67	159.6 ± 2.4
36	77.1 ± 6.2	69	174.0 ± 14.7
42	73.0 ± 6.2	72	163.8 ± 16.5
43	66.6 ± 3.2	75	182.2 ± 12.5
		77	156.0 ± 5.6
		81	157.4 ± 5.3
		83	148.2 ± 16.2 ^b
		85	138.8 ± 2.8 ^b
		89	160.6 ± 13.3
		90	171.1 ± 16.9
		91	162.7 ± 30.4
		92	223.7 ± 33.5
		93	193.1 ± 39.8 ^b
		94	219.4 ± 15.8 ^b
		100	185.4 ± 11.2
		102	175.5 ± 41.6 ^b
		107	178.6 ± 3.2 ^b
		109	181.5 ± 0.7 ^b
		116	232.6 ± 16.9 ^b
		118	235.6 ± 14.9 ^b
		125	158.3 ± 12.2 ^b
		127	175.1 ± 18.9 ^b

^a Expresado como la media ± error estándar.

^b Estos mutantes crecen más lentamente que la cepa control pero, una vez tenido en cuenta este factor, su capacidad de formar biofilm era superior a la de aquel.

RESULTADOS



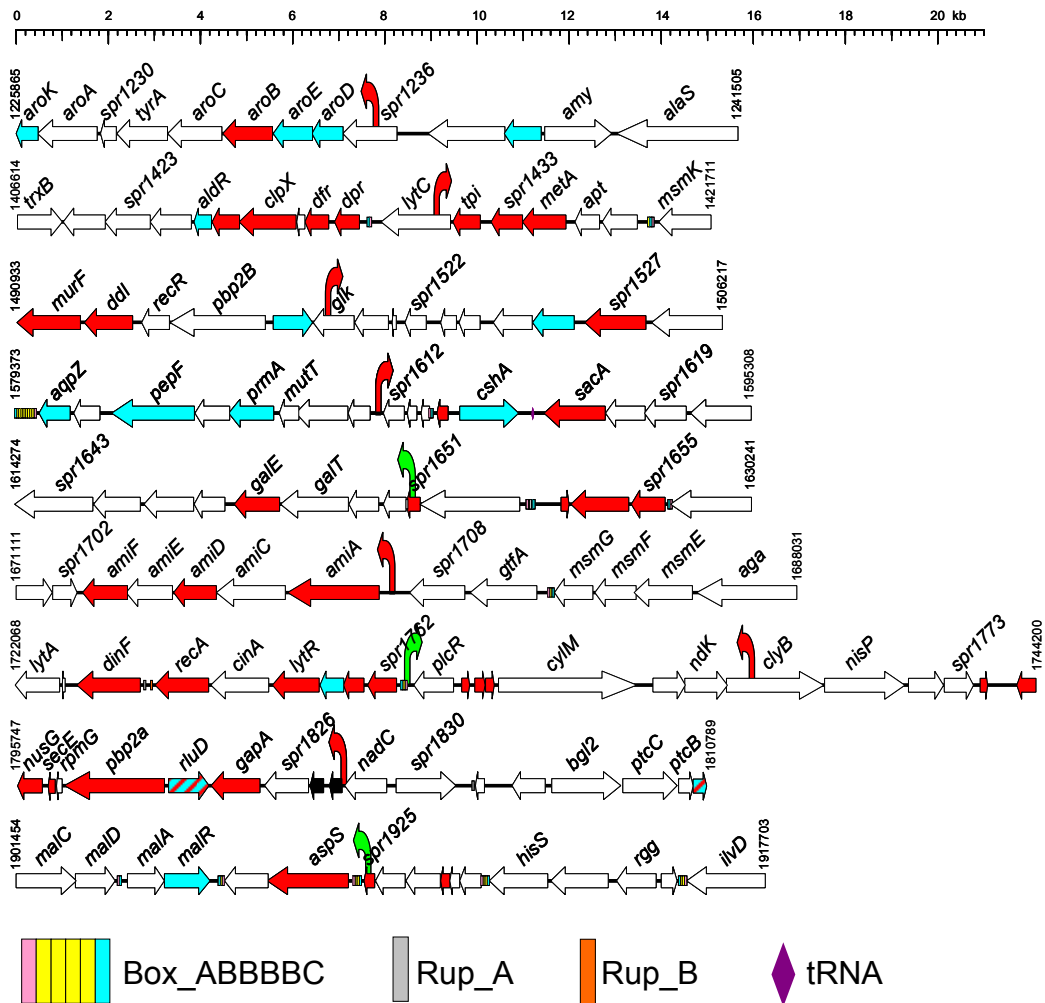


Figura 9. Representación esquemática de las regiones del genoma de *S. pneumoniae* R6 con inserciones *mariner* que afectan a la producción de biofilm. Se muestran las posiciones nucleotídicas del comienzo y fin de cada fragmento representado. Los genes se representan como flechas blancas que muestran la dirección de transcripción. Los genes coloreados en rojo o azul indican genes esenciales o no esenciales *in vitro*, respectivamente, que han sido propuestos como tales en varios trabajos de mutagénesis global (véase el texto). En caso de conflicto entre publicaciones, la flecha se ha marcado con rayas de ambos colores. Las flechas horizontales de color negro representan genes que codifican transposasas, completas o no. Las inserciones se indican por flechas verticales que indican la dirección de la inserción y sus colores representan aumento (color verde) o disminución (color rojo) de la producción de biofilm. También se indican las posiciones de algunas secuencias repetidas características de neumococo como BOX (Martin *et al.*, 1992; Knutsen *et al.*, 2006) y Rup (Oggioni y Claverys, 1999; Llull *et al.*, 2001a) que pueden afectar a la transcripción de los genes adyacentes.

RESULTADOS

```

    galM
72866 TAAAAAAGCTGGTCAAAAAGTCTTTAAAAATAAAATAACGCATATTGTCAGGTGATGAAA
72926 AGTTTGATAAATATGCGTTTATATGAAAATGATTACTTTATATATTATCCTGAAATGGTGT
                                     ▲
72986 TATTTTTGAGTTATCTGGCTTGACTTTCTTGATGGAATTATATAATAGTTGTAATAATA
73046 ATAATTACAACGAGAAAAGAGGACCATTATG
                                     spr0066
-----
    bglH
504993 TAGTTTGTATTATGATGATTAGATATTATCACGGTTAAGGCAGCATCTCATTAAATATGA
                                     ▲
505053 AATAAAGAGGTTTGGAAACATCAAATTCATAACCTCTTTATTTTATAGGGGATTAATT
505113 AATTTAATTTGTTACAGAGAGCCGATTATAAAATAGTTAACTTAGGATAGATTGGTTATA
505173 TATAGTAGACTGAATCTAAAATAGTACGAAACAATTGCTAAAACATTTATAGAAATTAAT
505233 TTTACTTTCCCAATCGATTTGTTTTCATCTTATTTCATCCGCTATAAAGTTAGATAAGA
505293 ATAAGCTAACAAAGCAGAAGTAAGATAGGTCTTGCAAGAATGGTAAAATCTGATAAACTA
505353 AGTGGTAATTGAATAGAAATCTGAAAGACTAGTAGCCCAAGGGAAGTATATCAGGGAGGA
505413 GAGCCGTGACTGCAAGCTCTCTATATGAAAGCTGGTGAATTCACCTGCGCATGGATTTA
505473 GAAATGAAGTCTGACTTGTTCAGATGAAAACGGATGGTACCCGCTGTCAACGCTCCGAGT
505533 GGAGTTTTTGGCATGTGGTTTTCTTTTATCTACGAGAGACTGATGGAGGAAATATG
                                     pheS
-----
    spr0606
619393 CATTTACTAACATCAAGCTTTTTCAATTTTCATTTAGACAGTCATTTGAATTTTCCGTAT
619453 TAGTCTTGCAGCAAGAGATTAATAGAAATAGTCATTATTTTATTGATTGCGGACTGAGGG
619513 ACTAGAGTATGTTTTACTTAGCCCTCTTTTATTTTATAAAGTTAGGTTTGTATAGAGA
619573 ATTGTTGATAAGATTAAGATATTACCTACCTTATGAGGGACAGTATCATCTATATATA
                                     ▲
619633 CCATCCAGTAAGAAACATGTATTAGTTGGAAACAGGAAAAAAATGGTTAGAGCAACTAA
619693 TAGGTCAAGAAATTTACCATATCGGACTTATAATG
                                     spr0607
-----
    spr1612
1587347 TAGGATTAAGCGTGGTATCGTGGTAATAGTCAATAAAAAAGCACGTCCACTTGTGCTAGT
1587287 TACTCGCCTATTGATTTTATAGATTTATTAGCCCTTTTCGCGGCTTTTATATTGATTTT
1587227 TATGAGAAATGAAGAAATCAGACTTTTAAGAAATCATTGATACCAAGGGTTTAAATGA
G
1587167 GTAATATGGTATAATTAGGACATAAAATAATTTTGTGGTAAGATGGTAGTATCTATTTTA
                                     ▲
1587107 GCATATTTCCGAGCAATCGGGCGATTAAAGAGTCGCATAGAAAGAGGACAAAATG
                                     spr1611
-----
    plcR
1730706 TAGTTAATCTTGACATTATAGTTTTTCTGAAACGTTAAATAACCTGTAAGGCTGATAGTT
1730646 AGATTAACTATCAGCCTTATAATTATGTGACTCTGAGTCCGCTCAGCTCCGTGAGGTG
1730586 CGAGACAAAACAACCCCGTTTGCAGGATTTTCATGATTTCAAATTTATATTCTTCGAA
1730526 AATCTCTTCAAATCAGTCAGCTCTATCTGCAATCTCAAAACACTGTTTTGAGCAACCTG
1730466 TGGCTAGCTACCTAGTTTGATCTTTGATTTTCATTTGAGTATTAGTCTCTAGTCTTTCTTTT
                                     ▲
1730406 ACGCTCTTAAAGACACATTTGACAGATTAGAAACAGTTCTCTCTTTTCTCCTAGTATAA
1730346 TGATTGGTAGGAAGGGAGAGAGAATG
                                     spr1762
-----
    nadC
1803126 TANGTTGTAATAATAACTAACTTTTTAAAGGATGTCTTTCTCTAGAACGAGTTTTATGT
                                     ▲
1803066 CAGATAGTTTAAACGCCTCTTCAAATATAGTAAATGAACCAAAAATAGTACACAATG
                                     spr1828

```

Fig. 10. Secuencia nucleotídica y características principales de las regiones intergénicas de *S. pneumoniae* en las que se han localizado minitransposones *mariner* que afectan a la síntesis de biofilm. Se indican los codones de iniciación (en verde) y terminación (en rojo) de los genes flanqueantes y la localización en el genoma de la cepa R6. En los genes *pheS* y *spr0607* se señala más de un codón de iniciación debido a la existencia o no de un sitio de unión al ribosoma a una distancia adecuada de dicho codón. En esta misma región se indica, en cursiva y subrayado, la secuencia de la caja T (*T-box*). El lugar donde ha tenido lugar cada inserción se señala en negrita y subrayado y la dirección de la misma mediante una

punta de flecha. Los posibles promotores se han destacado en azul claro o fucsia dependiendo de la cadena de DNA, incluyendo algunos promotores -10 extendidos (Sabelnikov *et al.*, 1995). El codón de terminación de *spr0606* se muestra en amarillo porque corresponde a la cadena complementaria a la mostrada aquí. En gris, se resaltan una secuencia repetida (RupB_2; entre *bglH* y *pheS*) y una Box_CBA (entre *plcR* y *spr1762*), características de neumococo. En posición 5' de *spr1762*, se indican, en fondo azul oscuro, las dos repeticiones (imperfectas) directas de 9 nucleótidos reconocidas por ComE (Knutsen *et al.*, 2004).

Estos posibles genes esenciales se indican en color rojo en la figura 9. Por otro lado, es notable que, aproximadamente, el 50% de las proteínas identificadas en esta Tesis como implicadas en la formación de biofilmes, se expresan *in vivo*, de acuerdo con un estudio proteómico reciente (Sun *et al.*, 2011a). En concreto, se trata de las proteínas Spr0033, Spr0065 (GalM), Spr0148 (DapE), Spr0450 (HsdR), Spr507 (PheS), Spr0543 (UvrC), Spr0711 (DinG), Spr0820, Spr0905 (YfnA), Spr0908 (PhtE), Spr1038, Spr1236, Spr1431 (LytC), Spr1611, Spr1763 (PlcR), Spr1770 (ClyB) y Spr1925. Por otra parte, existe evidencia experimental indicando que los genes *spr0099*, *dapE*, *hsdR*, *spr0601*, *yfnA* y *spr1236* desempeñan funciones esenciales para el desarrollo de neumonía (Hava y Camilli, 2002).

La proteína Spr0033 se une, posiblemente, a la coenzima A ya que posee un motivo *CoA_binding* (PF02629). Además, se ha visto que la expresión del gen *spr0033* se inhibe poco tiempo después de exponer neumococo a un cultivo de macrófagos humanos (Song *et al.*, 2009). El gen *spr0099* está localizado en una de las regiones del genoma (RA2), denominadas regiones accesorias (RAs), que existen en algunos aislados de neumococo pero no en todos ellos (Blomberg *et al.*, 2009). Resulta interesante señalar, además, que el gen *spr0098*, localizado en posición 5' de *spr0099* y separado del mismo por sólo 56 nucleótidos, codifica una posible bacteriocina de 82 aminoácidos, de acuerdo con lo predicho por el programa BAGEL (de Jong *et al.*, 2006) (http://bioinformatics.biol.rug.nl/websoftware/bagel/bagel_start.php). Recientemente, se ha determinado la estructura tridimensional de DapE (número de acceso en la base de datos PDB, 2pok) apoyando la predicción de que esta proteína es una metalopeptidasa en la que el residuo Glu157 podría formar parte del centro activo. LacG (Spr0424) parece ser una 6-fosfo-β-galactosidasa si se tiene en cuenta que, aproximadamente, muestra una identidad/similitud del 46/67% con proteínas de *Streptococcus gordonii* ($\log_{10}E = -160$) (Bolken *et al.*, 2001) y *Streptococcus mutans* ($\log_{10}E = -158$) (Honeyman y Curtiss, 1993, Zeng *et al.*, 2010) en las que se ha demostrado tal actividad enzimática. El gen *lacG* se en-

cuentra situado en la RA12 (Blomberg *et al.*, 2009) y, de acuerdo con el uso de codones de neumococo, debería transcribirse eficientemente (Martín-Galiano *et al.*, 2004).

El gen *spr0450* (*hsdR*) se ubica en la RA13 (Blomberg *et al.*, 2009). La transcripción de los genes *bglH* (*spr0506*) y *pheS* (*spr0507*) se estimula en una forma *rel_{spr}*-independiente, esto es, por el estrés causado por la inhibición de la traducción, como resultado de un tratamiento con mupirocina (Kazmierczak *et al.*, 2009). Este antibiótico inhibe la formación del tARN de la isoleucina (tRNA^{Ile}) (Hughes y Mellows, 1978). Como se ha demostrado en muchas otras bacterias (Gutiérrez-Preciado *et al.*, 2009), *pheS* debe regularse mediante la denominada caja T (*T-box*) (Fig. 10) (un sistema de antiterminación). Además, resultados recientes indican que PheS es una fosfoproteína (residuo fosforilado Ser229) (Sun *et al.*, 2010) que se encuentra asociada a la membrana celular de neumococo (Sun *et al.*, 2011b). Se ha sugerido que la proteína UvrC (Spr0543) actuaría en coordinación con UvrA (Spr0171) y UvrB (Spr1118) (Sicard *et al.*, 1992) en la reparación de daños en el ADN. Los genes *spr0606* y *spr0607* se encuentran localizados en una de las regiones accesorias (RA17) del genoma de neumococo y, recientemente, se ha demostrado que Spr0607, que posee varios posibles dominios transmembranales, es una metalopeptidasa (Kwon *et al.*, 2011). Por otra parte, se ha descrito que DinG (codificada por el gen *spr0711*) se encuentra fosforilada en el residuo Ser224 (Sun *et al.*, 2010). Esta proteína contiene dos dominios, *RNase_T* (PF00929) y *DEAD* (PF00270), este último característico de la familia de las helicasas de ARN (Linder y Jankowsky, 2011). En posición inmediatamente 5' del gen *speE*, que codifica la espermidina sintasa y que es necesario para que tenga lugar eficientemente tanto la colonización por neumococo como la neumonía (Shah *et al.*, 2011), se encuentra el gen *spr0820* que, muy probablemente, pertenece, como *speE*, a los genes implicados en la biosíntesis de poliaminas. Los genes *spr00819* a *spr0824* constituyen la RA20 (Blomberg *et al.*, 2009).

YfnA es, muy probablemente, una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia APC (*amino acid/polyamine/organocation*) de transportadores (Jack *et al.*, 2000). El gen que codifica YfnA (*spr0905*) pertenece a un único operón que comprende los genes *spr0903* a *spr0907* que codifican, respectivamente, las proteínas CcdA, tiorredoxina, YfnA, AdcAll (denominada Lmb en la Fig. 9) y PhtD. AdcAll ha sido caracterizada recientemente como una proteína que contiene Zn²⁺ (Loisel *et al.*, 2008). PhtE, el producto del gen *spr0908*, es junto con PhtD y otras, un miembro

de la denominada familia de proteínas con triada de histidinas, se encuentra localizado en la superficie celular (Adamou *et al.*, 2001) y posee propiedades inmunogénicas (Beghetto *et al.*, 2006; Giefing *et al.*, 2008). El gen *phtE* se expresa desde su propio promotor y no forma parte del operón mencionado anteriormente (Rioux *et al.*, 2011). Se ha observado recientemente que la transcripción de todos los genes de la familia Pht se inhibe por acción del regulador AdcR (Spr1978), en presencia de Zn^{2+} (Reyes-Caballero *et al.*, 2011; Shafeeq *et al.*, 2011).

Mientras que existe escasa información sobre los genes *spr0945* y *spr0964* —este último se encuentra localizado en la RA23 (Blomberg *et al.*, 2009)—, *spr1431*, codifica la lisozima LytC con capacidad autolítica a 30°C (López y García, 2004) y que es requerida para la formación óptima de biofilm (Moscoso *et al.*, 2006). Más recientemente, se ha demostrado la capacidad inmunogénica de LytC (Giefing *et al.*, 2008) así como su localización en la membrana de *S. pneumoniae* (Sun *et al.*, 2011b). Por su parte, *glk* (*spr1519*) se induce durante el desarrollo de la meningitis (Orihuela *et al.*, 2004) mientras *Spr1651* ha sido identificada como una proteína de membrana (Sun *et al.*, 2011b).

La proteína *Spr1763* (PlcR) es 26% idéntica (50% similar) ($\log_{10}E = -10$) al principal regulador *quorum sensing* (Q3EZ40) de la virulencia del grupo de *Bacillus cereus* (*B. cereus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringiensis*) (Rocha-Estrada *et al.*, 2010) cuya estructura tridimensional es conocida (Declerck *et al.*, 2007). Por su parte, la expresión de *spr1762* se reduce significativamente durante la infección meníngea (Orihuela *et al.*, 2004). Este gen monocistrónico, que es uno de los que se inducen tempranamente durante el desarrollo de la competencia (Peterson *et al.*, 2004), codifica una proteína de membrana, ComM, que es el factor de inmunidad de los neumococos competentes frente a la acción de las enzimas líticas propias y, en particular, de CbpD (fratricidio; véase apartado 1.5 de la Introducción) (Håvarstein *et al.*, 2006; Eldholm *et al.*, 2010). Al igual que otros genes implicados en el desarrollo de la competencia, la expresión de *comM* es inhibida por ClpP (Robertson *et al.*, 2002), una proteasa dependiente de ATP con importantes funciones en bacterias Gram-positivas (Frees *et al.*, 2007).

Finalmente, las predicciones del programa BAGEL de búsqueda de genes que codifican posibles bacteriocinas (ver más arriba), apuntan a que los genes *spr1765* y *spr1766*, situados en posición 5' de *clyP* (*spr1770*) y hasta *spr1774*, están implicados en la producción de bacteriocinas. Esta predicción ha sido comprobada experimentalmente y *Spr1770* parece ser la peptidasa implicada en el transporte de las

bacteriocinas modificadas así como en el procesamiento del propéptido (Majchrzykiewicz *et al.*, 2010). La transcripción de *clyB* (y de *spr1771*) se estimula notablemente poco tiempo después de la exposición de neumococo a macrófagos humanos (Song *et al.*, 2009). Por otra parte, los genes *spr1764* a *spr1771* constituyen una región accesoria (RA40) (Blomberg *et al.*, 2009).

1.2. Otros genes

Como ya se ha comentado en la Introducción de esta Tesis, *S. pneumoniae* es el principal agente etiológico causante de neumonía y meningitis en niños y personas mayores de 60 años. En la actualidad, a pesar de los avances biomédicos, la tasa de mortalidad debida a meningitis neumocócica se sitúa entre el 16% y el 37%. Además, la tasa de mortalidad infantil de la meningitis neumocócica es, como mínimo, el doble que la de la meningocócica y los supervivientes padecen una mayor incidencia de secuelas neurológicas. Debido a los frecuentes fallos terapéuticos en el tratamiento de meningitis producida por bacterias multirresistentes, a menudo se utiliza Van en los regímenes estándar para el tratamiento de la meningitis. Hasta ahora, afortunadamente, no se ha identificado ningún neumococo Van^R; sin embargo, se ha detectado la aparición de cepas de *S. pneumoniae* tolerantes a Van (VT) en algunos países (McCullers *et al.*, 2000; Henriques Normak *et al.*, 2001; Boost *et al.*, 2003; Hidalgo *et al.*, 2003; Gillis *et al.*, 2005; Sung *et al.*, 2006), pero no en otros (Antón *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2003; Decousser *et al.*, 2004a, b). Tratándose siempre de antibióticos que afectan a la síntesis de la pared bacteriana (como los β -lactámicos o los glicopéptidos), la tolerancia se define como un cambio en la actividad del antibiótico, de bactericida a bacteriostático (Moscoso *et al.*, 2011). Recientemente, llevamos a cabo el estudio de dos aislados clínicos VT de *S. pneumoniae* —uno de serotipo 23F, denominado S3, y otro de serotipo 14, denominado Tupelo_VT (Tabla 3)—, con la finalidad de caracterizar la tolerancia de estas cepas (Moscoso *et al.*, 2010). Mientras que la cepa S3 fue caracterizada como el primer mutante *lytA* natural, se pudo demostrar que la cepa Tupelo_VT contenía una mutación en el gen *ciaH* (alelo *ciaH*_{Tupelo_VT}; G592T; Ala198Ser) que codifica la histidín quinasa del sistema de dos componentes CiaRH (Zähner *et al.*, 2002). Existe evidencia experimental que indica que el sistema CiaRH está implicado en adherencia y colonización en modelos animales (Sebert *et al.*, 2002; Muñoz-Elías *et al.*, 2008), así como datos recientes que indican que los mutantes Δ *ciaRH* forman menos bio-

film y no se traslocan con facilidad de la nasofaringe a los pulmones o el cerebro (Trappetti *et al.*, 2011). Por otra parte, Hsu y cols. (2011) han observado que la Van promueve la formación de biofilmes en cepas no susceptibles de *S. aureus*. Todos estos datos nos llevaron a investigar si los mutantes naturales (clínicos) VT de *S. pneumoniae* poseen alguna alteración en su capacidad de formación de biofilm y, efectivamente, pudo comprobarse que las cepas tolerantes a Van formaban menos biofilms que las cepas isogénicas, no tolerantes a vancomicina (VNT) correspondientes (Fig. 11A).

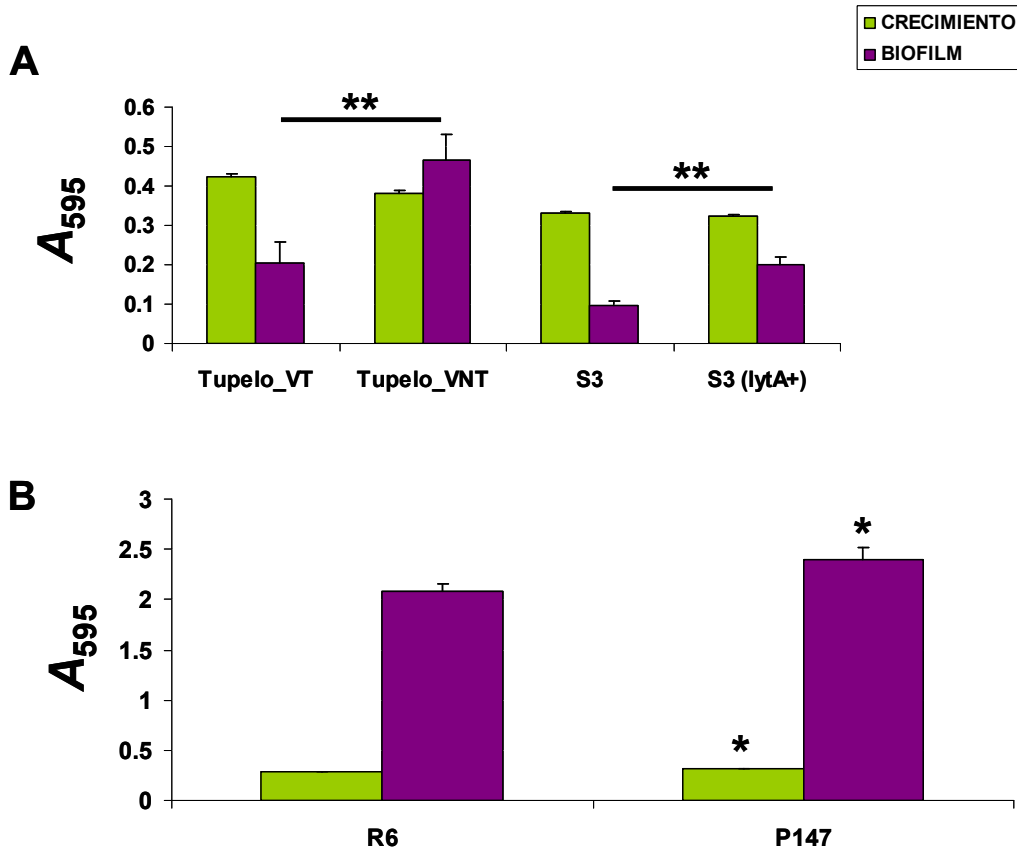


Figura 11. Crecimiento y formación de biofilm de las cepas VT (Tupelo_VT y S3) y las cepas VNT (Tupelo_VNT y S3 (lytA⁺)) (A) y de las cepas R6 y P147 (B). *, $P < 0.05$ y **, $P < 0.01$.

Con el fin de profundizar más sobre el gen *ciaH*, se pasó la mutación del gen *ciaH* de la cepa Tupelo_VT a la cepa R6 (P147) y analizamos su capacidad de formación de biofilm. La cepa P147 formó un 15% más de biofilm que la cepa silvestre R6, pero hubo diferencias significativas también en el crecimiento, la cepa P147 creció más que la cepa silvestre R6 (Fig.11B).

Además de estudiar la implicación del sistema CiaRH, nos propusimos tratar de elucidar si otros genes que han sido descritos en otras bacterias como importantes para la formación de biofilmes, adhesión y/o colonización, también desempeñan algún papel en el caso de los biofilmes neumocócicos. En concreto, se estudiaron cuatro genes: *htrA* (*spr2045*), *phaB* (*spr0375*), *fabT* (*spr0376*) y *galU* (*spr1903*). La serín proteasa HtrA está implicada, entre otras funciones, en el procesamiento y maduración de proteínas extracelulares, su síntesis está inhibida en un mutante Δ *ciaRH* y la carencia de esta proteína está asociada con una disminución en la capacidad de colonización nasofaríngea (Sebert *et al.*, 2002; Halfmann *et al.*, 2007b; Dawid *et al.*, 2009). Además, los mutantes *htrA* de otras especies bacterianas como *S. mutans* (Ahn *et al.*, 2005; Biswas y Biswas, 2005) o *Listeria monocytogenes* muestran una disminución notable en su capacidad de formación de biofilms (Wilson *et al.*, 2006).

En diversas bacterias Gram-negativas y más concretamente, en *Xanthomonas campestris*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cenocepacia* y *P. aeruginosa* se ha descrito la biosíntesis de un “factor señalizador difusible” (*diffusible signal factor*), un ácido graso *cis* insaturado, implicado, entre otras funciones, en la formación y dispersión de los biofilmes (Davies y Marques, 2009; Ryan y Dow, 2011). Recientemente, se ha observado que un compuesto estructuralmente similar, el ácido *trans*-2-decenoico, es también sintetizado por *S. mutans* y aislados de SGM como *S. mitis*, *S. oralis* y *S. sanguinis* (Vílchez *et al.*, 2010). En *X. campestris* y *S. maltophilia*, el factor señalizador es sintetizado con la participación de la proteína RpfF. Esta proteína es notablemente semejante ($E = 10^{-6}$) a otra de *Streptococcus mitis* (Núm. de acceso EFM32326) que es, a su vez, homóloga ($E = 10^{-15}$) a Spr0375 de *S. pneumoniae* R6. Esta proteína, denominada PhaB en el genoma de la cepa R6, es actualmente conocida como FabM y forma parte del *cluster* de genes biosintéticos de los ácidos grasos (Marrakchi *et al.*, 2002). Los mutantes *fabM* no producen niveles detectables de ácidos grasos monoinsaturados (Altabe *et al.*, 2007). Por otra parte, el gen situado inmediatamente 5' de *fabM*, *spr0376* (*fabT*) es

un regulador transcripcional (represor) de todos los genes *fab*, a excepción de *fabM* (Lu y Rock, 2006; Jerga y Rock, 2009).

El gen *galU* (*spr1903*) codifica una UDP-Glc pirofosforilasa imprescindible para la biosíntesis capsular (Mollerach *et al.*, 1998; Bonofiglio *et al.*, 2005). Existe evidencia experimental indicando que los mutantes *galU* de diversas bacterias Gram-negativas están atenuadas (véase, Jayakar *et al.*, 2011 y las referencias incluidas). En neumococo, los mutantes *galU* son incapaces de diseminarse por vía sanguínea (Marra y Brighman, 2001) y están atenuados *in vivo* (Meng *et al.*, 2008).

Sobre la base de estos datos previos, nos pareció interesante interrumpir los genes *htrA* (cepa P153), *fabM* (mutante P177), la expresión de *fabT* (cepa P179) y *galU* (cepa P195) (Tabla 3) mediante la inserción del minitransposón *mariner* para analizar su posible efecto en la formación de biofilm. En ninguno de estos mutantes se encontró un cambio significativo en la capacidad de formación de biofilm con respecto a la cepa silvestre.

2. PAPEL DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR EN LOS BIOFILMES DE *S. pneumoniae*

Aunque el principal factor de virulencia de *S. pneumoniae* es el CPS, su papel en colonización es discutible. Se ha sugerido que la biosíntesis del CPS interfiere con la colonización pero parece que la adherencia de neumococo a las células nasofaríngeas es serotipo-específica y se requiere una cantidad mínima de CPS para una colonización eficiente en ratones (Magee y Yother, 2001). Sobre estas bases experimentales nos propusimos investigar la influencia del CPS en el establecimiento del estado de portador utilizando un ensayo de formación de biofilm como modelo de colonización.

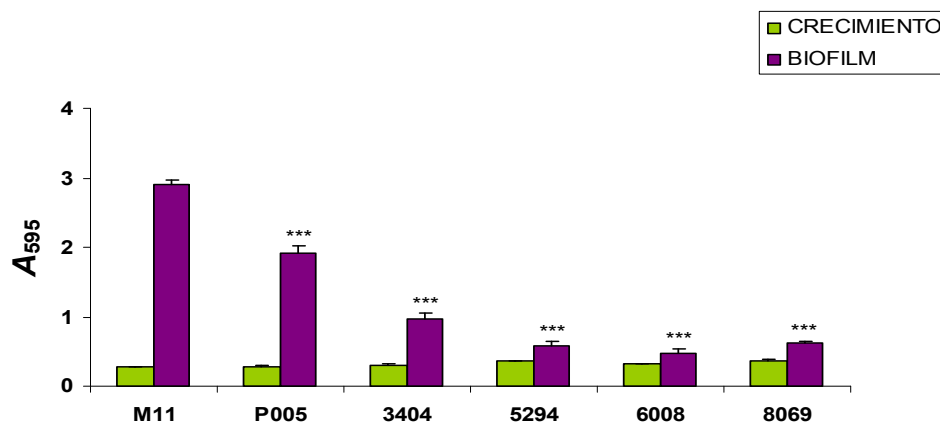


Figura 12. Crecimiento y formación de biofilm de la cepa no capsulada y las cepas capsuladas de serotipo 1. ***, $P < 0.001$.

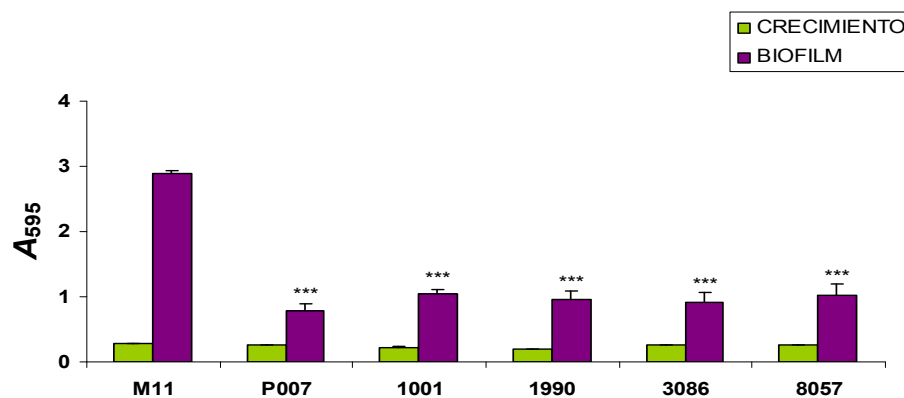


Figura 13. Crecimiento y formación de biofilm de la cepa no capsulada y las cepas capsuladas de serotipo 3. ***, $P < 0.001$.

2.1. Biofilm de cepas capsuladas serotipos 1 y 3

Basándonos en un trabajo previo del laboratorio donde se realizaron ensayos de formación de biofilmes con neumococos de distintos serotipos capsulares (una cepa por serotipo) (Moscoso *et al.*, 2006), decidimos ampliar el ensayo. Picazo y cols. (2011) llevaron a cabo un estudio donde de 330 casos de IPD en niños menores de 15 años, el 26.1% se debían a cepas de serotipo 1 y el 3.9 % a cepas de serotipo 3, además el serotipo 1 causaba en un alto porcentaje IPD en niños mayores de 3 años, siendo la incidencia de un 51.4% en niños de entre 3 y 5 años. También el incremento de neumonía neumocócica con empiema ha sido relacionado con la introducción de la vacuna PCV7, siendo los serotipos 1 y 3 los serotipos no vacunales más frecuentemente causantes de neumonía con derrame pleural durante el periodo postvacunal PCV7 (Muñoz-Almagro *et al.*, 2010; Burgos *et al.*, 2011). Por todo ello, decidimos ampliar el ensayo con los serotipos 1 y 3. Se utilizaron 4 cepas de cada serotipo capsular y, como controles, la cepa M11 no capsulada y un transformante de la cepa M11 con la cápsula de serotipo 1 (P005) o 3 (P007) para determinar si el CPS desempeña un papel importante en la formación de biofilmes.

Se comprobó que las cepas capsuladas tanto de serotipo 1 (Fig. 12) como de serotipo 3 (Fig. 13) formaban un biofilm significativamente menor que la estirpe no capsulada M11. Además, con estos ensayos se pudo determinar que no parecen existir diferencias significativas en la formación de biofilm entre cepas clínicas de los serotipos 1 y 3, ni entre cepas clínicas del mismo serotipo, ni entre los dos *secuencias* analizadas dentro del mismo serotipo capsular.

Tras analizar la capacidad para formar biofilmes de aislados neumocócicos de diferentes serotipos, se pudo concluir que todos los CPS ensayados aquí y previamente (Moscoso *et al.*, 2006) inhiben la formación de biofilmes sobre superficies abióticas. Para profundizar más sobre el papel del CPS en la formación del biofilm elegimos cepas de serotipo 3 porque en estos aislados se distinguen con facilidad las colonias rugosas (formadas por las células no capsuladas) de las lisas (constituidas por neumococos capsulados) (García *et al.*, 1993). Para este estudio se usó la cepa capsulada M23 construida por transformación de M22 Δ lytA32 con ADN de la cepa clínica 406 y, como control, la cepa M24 que es un mutante *cap3A* (no capsulado) de M23 (Tabla 3). De nuevo, se pudo confirmar que las cepas no capsuladas forman mayor biofilm que las capsuladas. En consecuencia, es muy probable

que la cápsula de neumococo constituya una barrera física que dificulta el acceso de las moléculas de la superficie bacteriana al sustrato (Fig. 14).

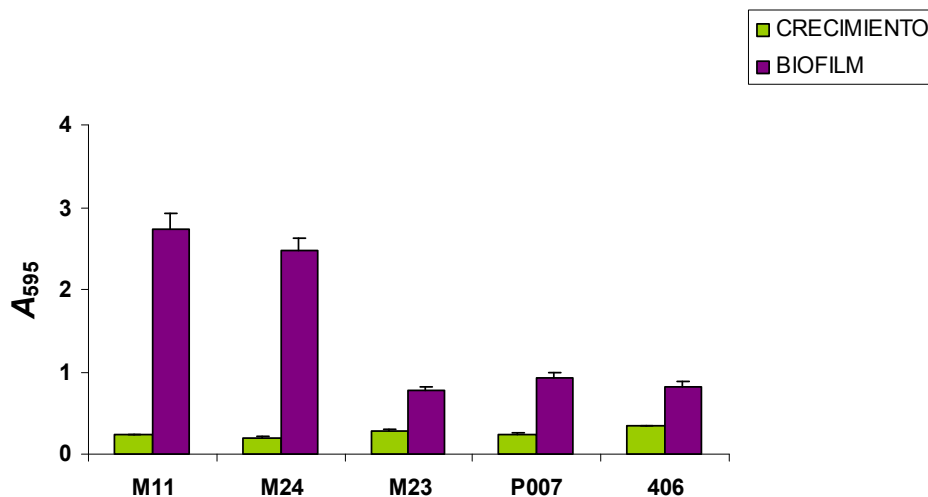


Figura 14. Comparación de la capacidad de formación de biofilm de varias cepas de serotipo 3 (M23, P007 y 406). Como controles se usaron las cepas no capsuladas M11 y M24.

2.1.1. Aislamiento de mutantes espontáneos no capsulados de neumococo serotipo 3 asociados a la formación de biofilm

Para tratar de aislar mutantes no capsulados espontáneos a partir de un biofilm de neumococo serotipo 3, se inoculó una placa multipocillo con la cepa M23 que se incubó 6 h a 34°C para la formación del biofilm. Trascurrido este tiempo de incubación se retiró el cultivo planctónico y se resuspendió el biofilm en medio CpH8 (0.2 ml) que, a continuación, se disgregó con una punta de pipeta. Después de llevar a cabo las diluciones correspondientes se sembraron 0.1 ml de cada dilución en placas de agar-sangre que se incubaron a 37°C durante 24 h. Las colonias se observaron con la ayuda de una lupa binocular y se resembraron en placas de agar-sangre todas aquellas colonias de pequeño tamaño y de fenotipo aparentemente

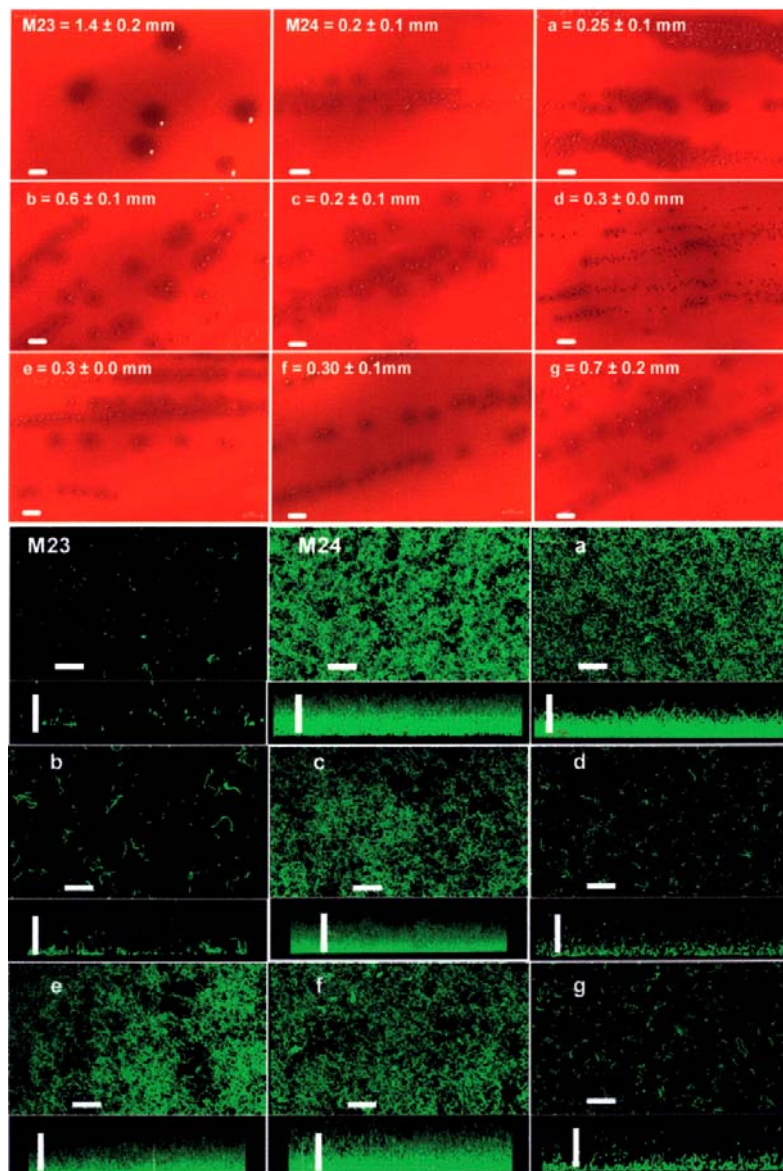


Figura 15. Morfología de las colonias y capacidad de formación de biofilmes de la cepa capsulada de serotipo 3 y los distintos grupos de mutantes. Panel superior, morfología y tamaño medio de las colonias de los diferentes grupos de mutantes y los controles, en placas de agar-sangre después de ser incubadas 24 h a 37°C. Barra, 1 mm. Panel inferior, reconstrucciones tridimensionales horizontales (plano xy) y verticales (plano xz) de diferentes imágenes al CLSM de los biofilmes de los distintos grupos de mutantes y los controles M23 (serotipo 3) y M24 (mutante rugoso de M23). Estos biofilmes se formaron en placas con fondo de vidrio a 34°C durante 16 h. Las células del biofilm se tiñeron de verde con el fluorocromo SYTO 9. Barra, 20 μm .

RESULTADOS

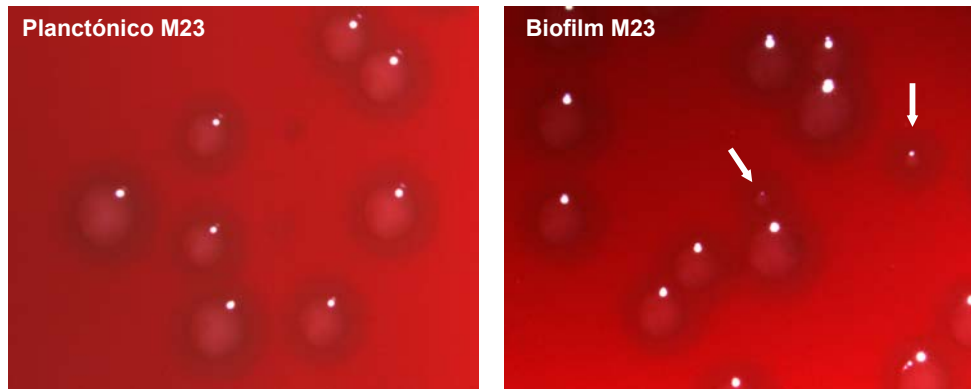


Figura 16. Morfología de las colonias de la cepa M23 aisladas de un cultivo planctónico o de un biofilm en placas de agar-sangre. Las flechas indican mutantes espontáneos no capsulados de M23.

Tabla 11. Mutantes espontáneos no capsulados aislados de biofilmes de neumococo serotipo 3

Cepa	Descripción de los mutantes de M23	Grupo de mutantes
Cap3-1	No capsulado	a
Cap3-2	Parcialmente capsulado	b
Cap3-3	Parcialmente capsulado	g
Cap3-4	No capsulado	a
Cap3-5	No capsulado	c
Cap3-6	No capsulado	f
Cap3-7	No capsulado	a
Cap3-8	Parcialmente capsulado	b
Cap3-9	No capsulado	a
Cap3-10	No capsulado	a
Cap3-11	No capsulado	a
Cap3-12	No capsulado	c
Cap3-13	Parcialmente capsulado	b
Cap3-14	No capsulado	a
Cap3-15	No capsulado	a
Cap3-16	No capsulado	a
Cap3-17	No capsulado	d
Cap3-18	No capsulado	e
Cap3-19	No capsulado	a
Cap3-20	No capsulado	a
Cap3-21	Parcialmente capsulado	b
Cap3-22	No capsulado	c
Cap3-23	No capsulado	a
Cap3-24	No capsulado	e
Cap3-25	Parcialmente capsulado	b

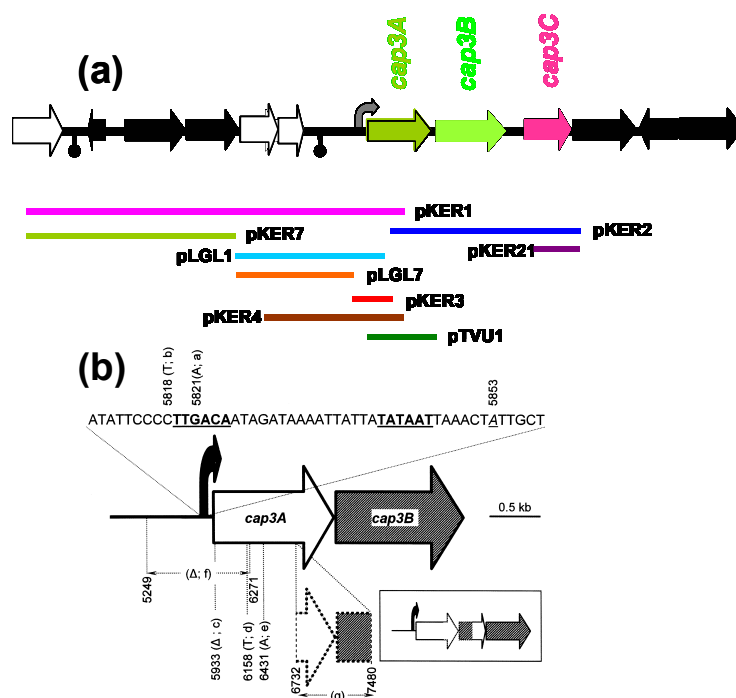


Figura 17. Diagrama del operón capsular de *S. pneumoniae* serotipo 3. (a). Representación de la región del operón clonada en cada plásmido. Los genes requeridos para la síntesis del CPS están coloreados en verde. (b). Caracterización de las mutaciones que producen cepas de neumococo no capsuladas. El grupo de la mutación se indica después de cada una de ellas. Las regiones promotoras -10 (TATAAT) y -35 (TTGACA) se indican subrayadas y en negritas. El inicio de la transcripción se muestra subrayado y en cursiva.

Tabla 12. Localización de las mutaciones en el operón capsular tipo 3 por restauración del fenotipo capsular^a

Grupo	pKER1	pKER2	pKER3	pKER4	pLGL1	pLGL7	pTVU1
a	+	-	+	+	+	-	-
b	+	-	+	+	+	-	-
c	+	-	ND	ND	ND	ND	+
d	+	-	ND	ND	ND	ND	+
e	+	+	ND	ND	ND	ND	+
f	+	-	-	+	-	-	-
g	+	+	+	-	+	+	+

^a Abreviaturas: +, restauración del fenotipo capsular tras la transformación; -, no restauración del fenotipo capsular tras la transformación; ND, no determinado.

RESULTADOS

Tabla 13. Tipos de mutaciones, posición, localización y grupo de mutantes al que pertenecen.

Tipo de mutación	Mutación	Posición nt ^a	Posición aa ^a	Localización	Grupo
Transición	G→A	5821		Caja -35 del promotor <i>cap3</i> (TTGACA→TTAACA)	a
		6431	W174Stop	Codón stop prematuro (TAG) en gen <i>cap3A</i>	e
	C→T	5818		Justo antes de la caja -35 del promotor <i>cap3</i>	b
Inserción	G	6158	T83I	En gen <i>cap3A</i>	d
		5933–5934	S8R	Cambio de fase en gen <i>cap3A</i>	c
Delección	1023 pb	5249–6271		Delección del promotor y región 5' del gen <i>cap3A</i>	f
Duplicación	749 pb	6732–7480		Duplicación de la región 3' del gen <i>cap3A</i> (364 pb) y la región 5' del gen <i>cap3B</i> (370 pb)	g

^a Abreviaturas: nt, nucleótidos; aa, aminoácidos.

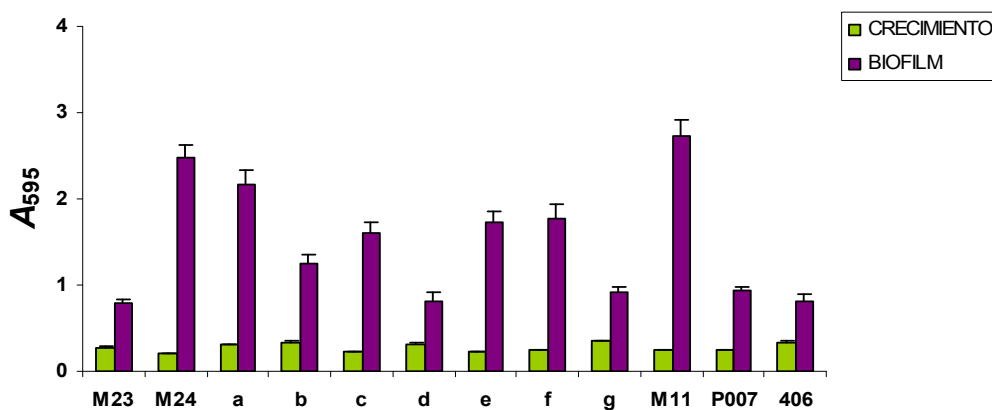


Figura 18. Crecimiento y formación de biofilm de un representante de cada grupo de mutantes no capsulados.

rugoso (Fig. 15). Entre un 10% y un 25% de las colonias aisladas del biofilm de M23 mostraron fenotipo no capsular y diferente morfología (Fig. 16) sugiriendo que puede aparecer simultáneamente más de un tipo de mutante capsular en el mismo biofilm. Para reducir las posibilidades de aislar mutantes idénticos, sólo aislamos una colonia rugosa de cada pocillo. Así, se obtuvieron 25 colonias independientes que fueron nombradas como Cap3-1 a Cap3-25 (Tabla 11).

2.1.2. Localización de la mutación y clasificación de los mutantes

Para localizar la mutación en cada uno de los mutantes se usó una colección de plásmidos de *E. coli* que contienen clonadas distintas regiones del operón capsular del serotipo 3 de *S. pneumoniae* (*cap3*) (Tabla 5) con objeto de tratar de restaurar el fenotipo capsular por transformación con los ADNs donadores que contienen los diferentes fragmentos (Fig. 17A). Así, los 25 mutantes no capsulados aislados pudieron ser clasificados en 7 grupos (del a al g) de mutantes distintos (Tabla 12).

Localizada la región donde se había producido la mutación, determinamos el tipo de mutación y su posición mediante PCR con oligonucleótidos específicos y secuenciación (Tabla 13 y Fig. 17B).

2.1.3. Formación de biofilmes por los mutantes no capsulados

Se realizaron varios ensayos de formación de biofilm en placas multipocillo, todos ellos en medio CpH8 e incubando entre 14 y 16 h a 34°C. Se usaron como controles las cepas no capsuladas M24 y M11 y las cepas capsuladas de tipo 3, M23, P007 y 406. La figura 18 muestra que, con la excepción de los neumococos del grupo d y g, todos los mutantes no capsulados formaban más biofilm que la cepa M23 y las otras cepas capsuladas. Si se compara la formación de biofilm en placas multipocillo con las imágenes obtenidas al CLSM usando vidrio como soporte abiótico para la formación de los biofilmes (Fig. 15 paneles inferiores) puede observarse que los resultados son consistentes. Los mutantes pertenecientes a los grupos b, d y g no forman biofilm sobre vidrio. Además, después de corregir los datos por el diferente crecimiento de las diversas cepas (Figs. 18 y 20), se pudo deducir que los mutantes de los grupos a, c, e y f forman más biofilm que la cepa M23, que los del grupo b forman ligeramente más biofilm que su progenitor y que los mutantes per-

tenecientes a los grupos d y g forman menos biofilm que la cepa M23 sobre poliestireno.

2.1.4. Cuantificación del polisacárido capsular de los mutantes no capsulados de *neumococo* serotipo 3

Con el fin de buscar una explicación a los resultados obtenidos tanto en la formación de biofilm en placas multipocillo como en plaquitas con fondo de vidrio, se llevó a cabo la cuantificación de la producción del CPS serotipo 3 de los controles y de los distintos grupos de mutantes espontáneos no capsulados. Como se puede observar en la figura 19 todos los mutantes analizados producen menos polisacárido que la cepa M23, aunque hay tres grupos de mutantes (los de los grupos b, d y g) cuya producción de polisacárido capsular es mayor que la del resto (a excepción de la cepa M23). Los mutantes del grupo b tienen la mutación justo antes del promotor (*cap3p*) del operón capsular y los del grupo g poseen una duplicación de los dos genes esenciales de dicho operón (Tabla 13); ambos grupos de mutantes forman poco biofilm al igual que la cepa parental M23 (Fig. 18) produciendo menos del 50% del CPS de esta cepa (Figs. 19 y 20). En el caso del grupo b, ello podría deberse a un defecto en la unión de la ARN polimerasa al promotor, que ocasionaría una reducción en la transcripción del operón *cap3*. Por su parte, el caso del grupo g podría deberse a que el ARN que se transcribe tendría una longitud mayor y podrían existir problemas de traducción. Se puede afirmar, que estos dos grupos de mutantes poseen un fenotipo de capsulados intermedios.

El grupo d sólo posee un representante, tiene fenotipo no capsulado y no forma biofilm aunque produce sólo un 10% de CPS respecto a la cepa parental (Figs. 15, 19 y 20). Se secuenció el operón capsular, comprobándose que sólo posee la mutación ya descrita, la cual produce el cambio de un aminoácido (Thr83 por Ile). Para desechar la posibilidad de que pudiera haber otra mutación adicional fuera del operón capsular que estuviera afectando a la formación de biofilm, se transformó la cepa M23 con un fragmento de PCR de 1165 pb que contenía la mutación en el operón capsular de este grupo d. Se analizó la formación de biofilm y la producción de CPS 3 de tres transformantes independientes y no se observaron diferencias significativas entre los transformantes y la cepa original del grupo d (mutante Cap3-17).

Para comprobar si la explicación de los resultados obtenidos en la cuantificación del CPS en el grupo d podría deberse a una liberación diferencial del CPS en fun-

ción de las fases de cultivo, se cuantificó la liberación de CPS en distintos puntos de la curva de crecimiento pero no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos grupos de mutantes y los controles.

2.1.5. Cultivos mixtos de cepas con y sin cápsula y formación de biofilm

Para comprobar si los mutantes no capsulados pueden promover la formación de biofilm de cepas capsuladas, se realizaron ensayos de formación de biofilm con cultivos mixtos, en proporción 1:1, de M23 y un transformante resistente a optoquina de M24 (cepa M24Opt) (Tabla 3). Se realizaron cuatro ensayos independientes, cada uno de ellos por triplicado, y se cuantificó cada ensayo mediante recuento de colonias en placas de agar-sangre con y sin antibiótico.

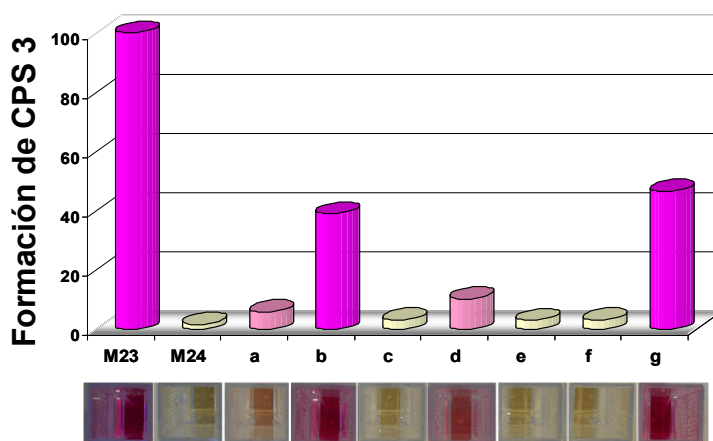


Figura 19. Cuantificación del CPS de tipo 3 de las cepas control M23 y M24 (con y sin cápsula, respectivamente) y de los mutantes no capsulados de un biofilm de M23. En la parte inferior se muestran los resultados del análisis colorimétrico (véase Materiales y Métodos).

RESULTADOS

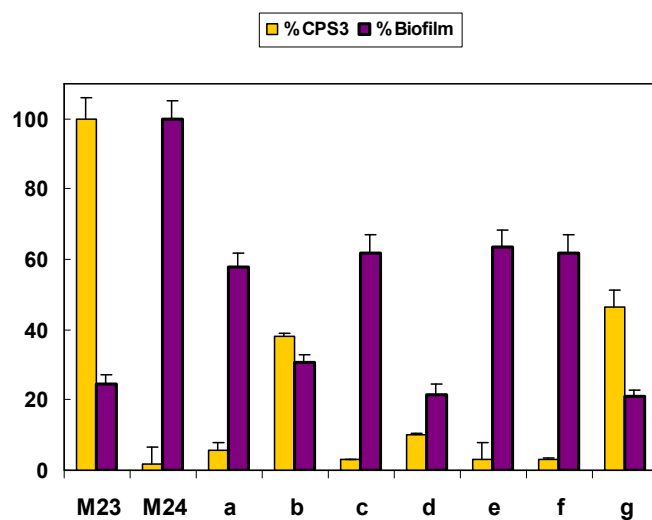


Figura 20. Ensayo de formación de biofilm y producción de CPS. Los porcentajes de formación de biofilm y de producción de CPS fueron normalizados con respecto a la cepa no capsulada M24 y la capsulada M23 de serotipo 3, respectivamente. La cepa M23 sintetiza, aproximadamente, $210 \pm 18 \mu\text{g}$ de CPS ml^{-1} de cultivo/ DO_{595} .

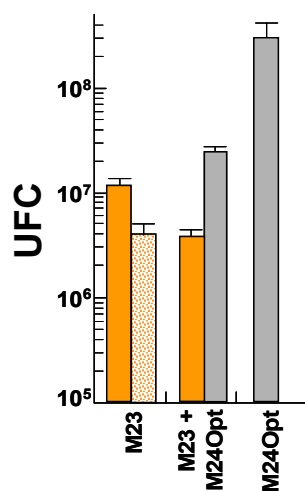


Figura 21. Capacidad de formación de biofilm de la cepa capsulada y no capsulada de *S. pneumoniae* y aparición de mutantes espontáneos no capsulados. Se indica el número de UFC de la cepa M23 (capsulada tipo 3), de la cepa M24Opt (no capsulada resistente a optoquina) y de un cultivo mixto (1:1) de ambas cepas en los correspondientes biofilmes. Se inocularon, aproximadamente, 4.5×10^6 UFC por pocillo. La barra anaranjada corresponde a la cepa M23, la punteada a los mutantes espontáneos no capsulados de M23 y la gris a M24Opt.

Como se muestra en la figura 21, la capacidad de formación de biofilm de la cepa capsulada M23 no se incrementó en el cultivo mixto (1:1). En cambio, el biofilm formado por el mutante no capsulado M24Opt contenía 10 veces más células cuando se inoculó sólo que en cultivo mixto, indicando que existe una competición entre ambas cepas. La cepa capsulada podría estar impidiendo el acceso al fondo del pocillo, a la cepa no capsulada, debido a la diferencia de volumen que existe entre la cepa capsulada y la no capsulada. Una cepa no capsulada de *S. pneumoniae* posee un volumen 1/8–1/10 veces inferior al de una cepa capsulada (Shaffer *et al.*, 1936; Wood y Smith, 1949). Al inocular la mitad del número de células de la cepa no capsulada, en el cultivo mixto se ve disminuida 10 veces la capacidad de formación de biofilm comparado con un cultivo puro de la misma, debido a la obstaculización de la cepa capsulada para poder adherirse a la superficie.

2.1.6. Caracterización funcional de los mutantes en el promotor del operón capsular de neumococo serotipo 3 (*cap3p*)

Entre los mutantes caracterizados existen dos grupos (a y b) que poseen mutaciones en *cap3p* y ambos producen menos CPS. Con el objetivo de determinar si tales mutaciones alteraban la transcripción del *locus* capsular, se utilizaron una serie de derivados del plásmido pLSE4 (Díaz y García, 1990) que contienen los diferentes promotores *cap3p* y que se introdujeron por transformación en la cepa M31 de *S. pneumoniae* (fenotipo no capsulado y Δ *lytA*) así como en *E. coli* C600. También se usó el plásmido pPP2 (*bgaA::tetM-lacZ*) (Halfmann *et al.*, 2007a) como vector para clonar los promotores controles y mutados introduciendo estos derivados en la cepa de neumococo R6 (no capsulada y *lytA*⁺) (Tabla 3).

Los transformantes M31 que llevan los plásmidos pLSP1, pLSE4_a y pLSE4_b se autolisan en fase estacionaria a diferencia de la cepa que lleva el plásmido pLSE4 que carece de promotor para la síntesis de la enzima lítica LytA. Como se puede ver en la figura 22, la autólisis de los mutantes del grupo b es más rápida que la de los mutantes del grupo a, lo que indica que los mutantes del grupo b poseen una mayor actividad promotora que los del grupo a. Se comprobó la actividad promotora de pLSE4 y sus derivados, mediante el análisis de la actividad enzimática de la NAM-amidasa LytA en extractos celulares obtenidos por sonicación, o de la actividad β -galactosidasa (Tabla 14). Estos resultados confirman claramente que la actividad promotora del grupo b de mutantes es mayor que la del grupo a.

Lacks y cols. (1986) demostraron que el número de copias de los plásmidos derivados de pLS1 (como en el caso de pLSE4) es, aproximadamente, de 25 copias en *E. coli* y de 4 copias en *S. pneumoniae*. Este hecho podría explicar las diferencias que se observan en la actividad NAM-amidasa en los derivados de *E. coli* y *S. pneumoniae*. También se ha sugerido que, debido al alto contenido en A+T de su genoma, muchas secuencias de *S. pneumoniae* pueden funcionar como promotoras en *E. coli* (Dillard y Yother, 1991). Ello corroboraría los resultados obtenidos ya que la actividad NAM-amidasa en los extractos sonicados de *E. coli* C600 (pLSP1) (alrededor de un 30% respecto a la cepa *E. coli* C600 (pLSE4_b) es sustancialmente mayor que la observada en neumococo (10% con respecto a la cepa que contiene el plásmido pLSE4_b) mientras que estas diferencias no las encontramos cuando las bacterias llevaban el plásmido pLSE4_a (Tabla 14).

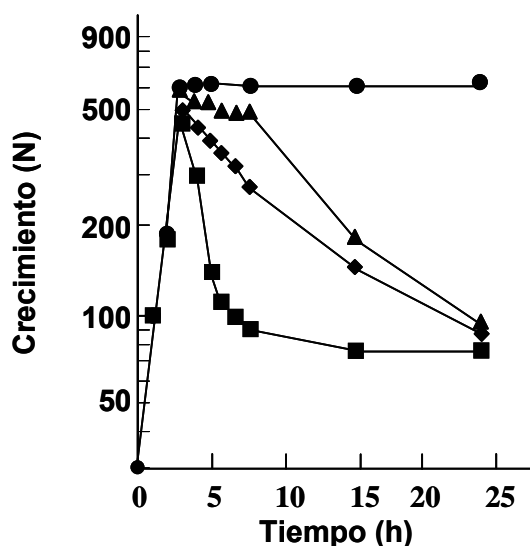


Figura 22. Curvas de crecimiento y lisis de *S. pneumoniae* M31 ($\Delta lytA$) y los transformantes obtenidos con los plásmidos, pLSE4 (círculos), pLSP1 (triángulos), pLSE4_a (rombos, grupo a de mutantes) y pLSE4_b (cuadrados, grupo b de mutantes). El ensayo se monitorizó por nefelometría (N). 1 N = 2×10^6 UFC ml⁻¹.

Se realizaron intentos repetidos para clonar *cap3p_{M23}* (el promotor silvestre del *cluster* capsular de tipo 3), empleando el gen *lytA* como reportero, en un plásmido de *S. pneumoniae* M31 o *E. coli* C600 pero siempre se obtenían transformantes con mutaciones en el promotor iguales a las ya descritas en esta Memoria (*cap3p₁₃*,

cap3p₂₀ o *cap3_{pLSP1}*). Ello podría deberse a una fuerte actividad promotora del promotor salvaje y a que tanta actividad NAM-amidasa fuese letal para la bacteria. Para resolver este problema, se decidió evaluar la actividad promotora usando el sistema pPP2 (Halfmann *et al.*, 2007a) que contiene el gen *lacZ* de *E. coli* como reportero y permite la fusión del promotor a estudiar con el gen *lacZ*; dicha fusión se integra en el locus *bgaA* de neumococo, obteniéndose así una integración estable en el genoma. Se determinó la actividad β -galactosidasa de los derivados de *S. pneumoniae* R6 conteniendo las distintas fusiones *cap3p-lacZ* (Tabla 14). La cepa R6_*p_{pLSP1}* (véase Tabla 3) poseía sólo un 0.3% de actividad promotora con respecto al promotor salvaje, indicando que la delección de un nucleótido en el espaciador provoca una pérdida importante de actividad promotora. La mutación que tiene el grupo a de mutantes también produce una disminución considerable de la fuerza del promotor. En cambio, la actividad promotora del grupo b se mantiene en más de un 80% con respecto al promotor salvaje, sugiriendo que el cambio C→T en la posición localizada inmediatamente en posición 5' de la caja -35, no afecta considerablemente a la actividad promotora. Estos resultados se ajustan a los obtenidos en la producción del CPS (Figs. 19 y 20) y a los tamaños de las colonias (Fig. 15). Así, el grupo a de mutantes tiene poca actividad promotora, sintetiza poco CPS (5% respecto a la cepa M23) y forma colonias pequeñas (0.25 mm de diámetro) mientras que el grupo b de mutantes posee una mayor actividad promotora, produce mayor cantidad de CPS (40% con respecto a la cepa M23) y el diámetro medio de sus colonias es de 0.6 mm. También los resultados obtenidos de la actividad promotora a través del análisis de la actividad NAM-amidasa o β -galactosidasa confirmaron los resultados observados con las curvas de crecimiento y lisis (Fig. 22 y Tabla 14).

2.2. Formación de biofilmes por neumococos del serogrupo 19

Como ya se comentó en la Introducción de esta Memoria, la utilización cada vez más amplia, desde el año 2000, de la PCV7 en la población infantil ha dado lugar a una notable disminución del número de casos de otitis media aguda e IPD producidos por neumococos de los serotipos incluidos en la vacuna (Nuorti *et al.*, 2010) y, de manera simultánea, a un incremento de los casos producidos por neumococos de serotipos no incluidos en la misma. En particular, los casos de IPD producidos por neumococos no susceptibles a la penicilina de serotipos no incluidos en la PCV7 se han incrementado y la mayoría de infecciones resistentes están causadas

en la actualidad por neumococos de serotipo 19A tanto en España como en el resto de países que han autorizado el uso de la PCV7 (Liñares *et al.*, 2010). Además de estos datos epidemiológicos, en el ámbito de los objetivos planteados en esta Memoria, es muy importante resaltar el hecho de que los neumococos de serotipo 19A han llegado a ser los más prevalentes como colonizadores de la nasofaringe infantil (Cohen *et al.*, 2010; van Gils *et al.* 2010; Hanage *et al.* 2011; Spijkerman *et al.*, 2011). Además, experimentos recientes llevados a cabo en un modelo experimental de otitis media en chinchillas empleando neumococos del mismo secuencitipo (ST199) pero de diferentes serotipos (15B, 15C, o 19A), han revelado que los neumococos con CPS de serotipo 19A colonizan más rápidamente la nasofaringe que los de los otros serotipos (Laufer *et al.*, 2010). El serotipo 19A es uno de los cuatro que integran el serogrupo 19 (19F, 19A, 19B y 19C) (Fig. 23A) y los genes responsables de su síntesis han sido secuenciados (Morona *et al.* 1997a, b; Morona *et al.* 1999a, b; Bentley *et al.* 2006; Aanensen *et al.* 2007; Mavroidi *et al.* 2007) (Fig. 23B). Los neumococos de los serotipos 19B y 19C son muy poco frecuentes en aislados clínicos (van Dam *et al.*, 1990; Nielsen y Henrichsen, 1992; Morona *et al.*, 1999b).

Tabla 14. Evaluación de la actividad promotora por determinación de la actividad NAM-amidasa de extractos celulares o por el sistema pPP2

Receptor	Plásmido	Actividad NAM-amidasa (%) ^a	Actividad β-galactosidasa (%) ^b
<i>S. pneumoniae</i> M31	pLSE4	0	NA ^c
	pLSP1	60 ± 5 (11)	NA
	pLSE4_a	169 ± 16 (31.1)	NA
	pLSE4_b	544 ± 48 (100)	NA
<i>E. coli</i> C600	pLSE4	0	NA
	pLSP1	922 ± 11 (33.2)	NA
	pLSE4_a	933 ± 10 (33.6)	NA
	pLSE4_b	2777 ± 25 (100)	NA
<i>S. pneumoniae</i> R6	pPP2	NA	0.7 ± 0.3
	pPP2_P1	NA	29 ± 3.3 (0.3)
	pPP2_a	NA	599 ± 27.6 (5.6)
	pPP2_b	NA	8929 ± 232.5 (82.9)
	pPP2_M23	NA	10773 ± 391.3 (100)

Cada valor corresponde a la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes.

^a En Unidades mg⁻¹ de proteína.

^b En nmol de nitrofenol liberado min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

^c NA, no aplicable.

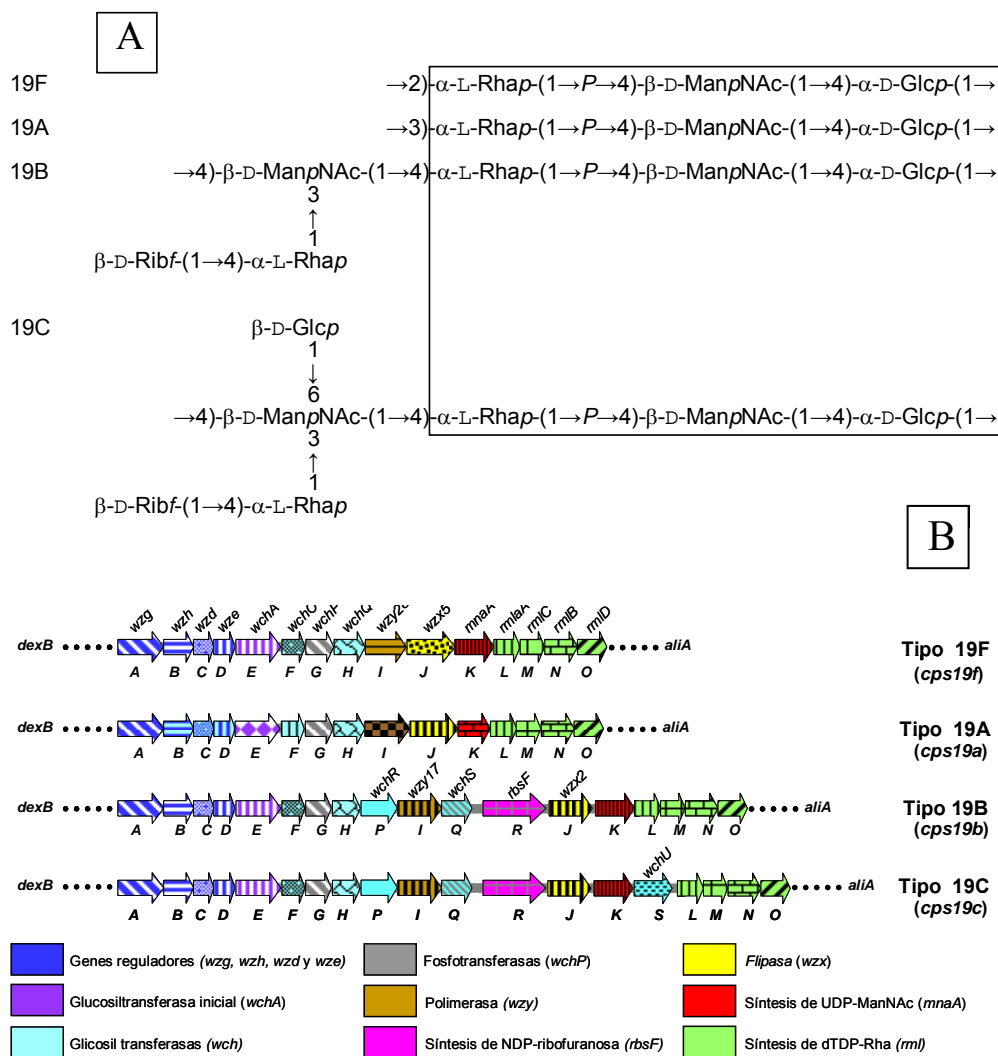


Figura 23. Unidades repetidas de los CPS serotipos 19F, 19A, 19B y 19C y organización de los respectivos *clusters* capsulares de neumococo. A. El trisacárido común se muestra enmarcado. Nótese que la diferencia entre los serotipos 19F y 19A radica en la existencia de un enlace 1→2 o 1→3 entre Glc y Rha en 19F y 19A respectivamente. *f*, furanosa; D-Glc, glucose; D-ManNac, *N*-acetilmanosamina; *p*, piranosa; *P*, fosfato; L-Rha, ramnosa; D-Rib, ribosa. Modificado de (Morona *et al.* 1999b; Kamerling, 2000). B. Los genes capsulares se encuentran situados entre los genes *dexB* y *aliA* en el genoma de neumococo. Los genes que poseen más de 90% de identidad se representan por flechas del mismo color y sombreado. Para nombrar los genes se han utilizado la nomenclatura clásica (Bernheimer y Wermundsen, 1972) y la propuesta por Reeves y cols. (1996). Modificado de trabajos previos (Morona *et al.* 1999b; García *et al.* 2000a; Bentley *et al.* 2006).

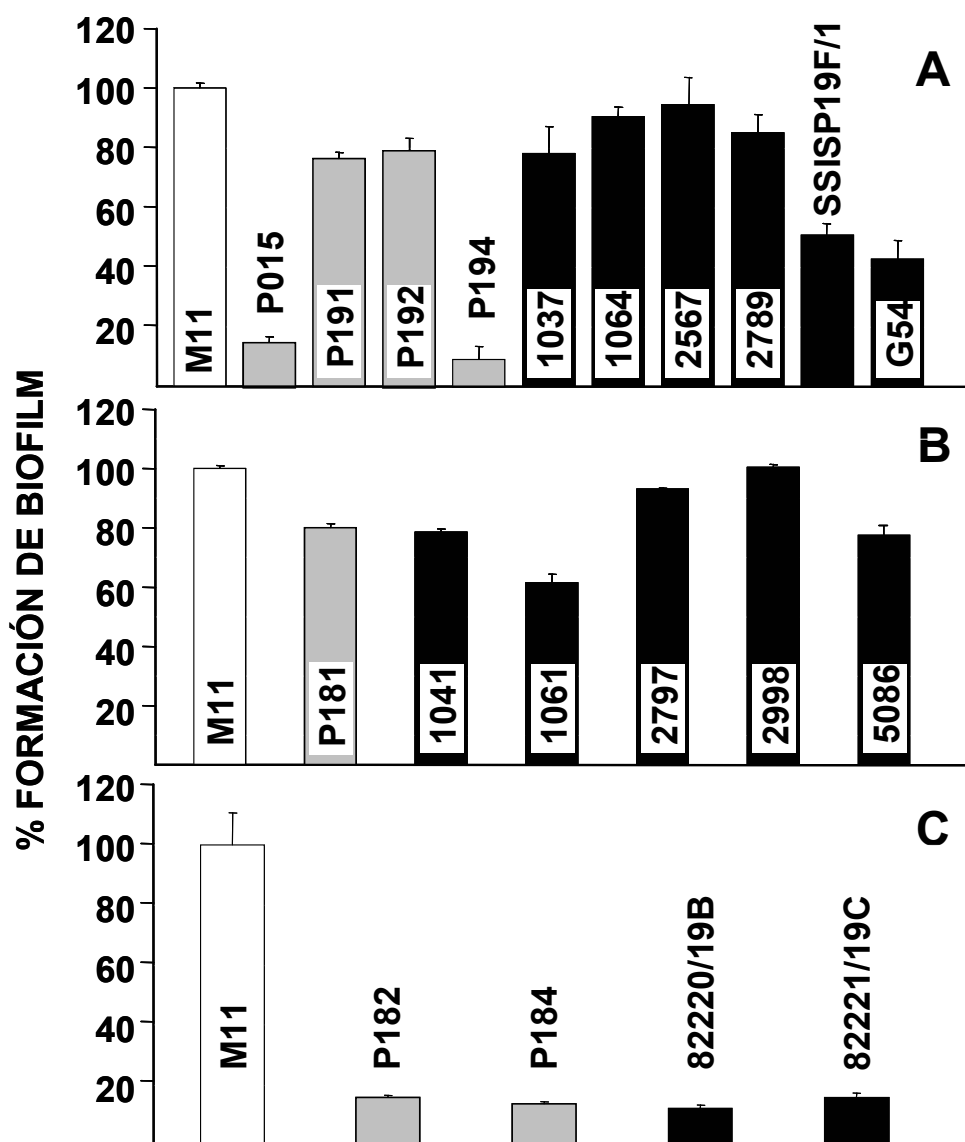


Figura 24. Formación relativa de biofilm de la cepa no capsulada M11 y las cepas capsuladas de serotipos 19F (A) (excepto P015, serotipo 23F), 19A (B) y 19B y 19C (C). Los transformantes capsulados de M11 se indican con barras grises mientras que las barras negras corresponden a aislados clínicos.

Sobre la base de los resultados mencionados en el párrafo anterior, nos propusimos investigar si el CPS de serotipo 19A posee alguna característica peculiar que pudiera explicar su elevada capacidad de colonización. Para ello, se utilizaron 4 cepas clínicas de serotipo 19A y seis de serotipo 19F [incluyendo la cepa G54 ya ensayada anteriormente (Moscoso *et al.*, 2006)] y, como controles, la cepa M11 no capsulada y tres transformantes de ésta expresando la cápsula de serotipo 19F (P015, P191 y P192) o la 19A (P181) (Fig. 24). Como ya se ha mencionado repetidamente, en trabajos anteriores se había descrito que, con independencia del serotipo, las cepas capsuladas de *S. pneumoniae* forman menos biofilm (aproximadamente, un 20%) que las no capsuladas (Moscoso *et al.*, 2006; Muñoz-Elías *et al.*, 2008). En particular, a la vista de los resultados obtenidos en esta Tesis, resultaba destacable el hecho de que la cepa G54 de serotipo 19F era capaz de formar, aproximadamente, un 40% del biofilm formado por M11 (Moscoso *et al.*, 2006). Este dato ha sido confirmado en esta Tesis (Fig. 24). Igualmente, la cepa SSISP/19F forma biofilm en una cantidad similar. Sin embargo, las otras cuatro cepas del serotipo 19F fueron buenos formadores de biofilm al igual que los transformantes P191 y P192 (Fig. 24). Por otra parte, pudimos confirmar que el transformante P015, originalmente atribuido al serotipo 19F (Moscoso *et al.*, 2006), formaba muy poco biofilm. Sin embargo, en un análisis posterior de esta cepa pudimos comprobar que, en realidad, la cepa P015 expresa un CPS de tipo 23F, y no 19F como se había dicho (Moscoso *et al.*, 2006). Además, se construyó un mutante binario (cepa P194 que expresa dos CPS simultáneamente; en este caso, serotipos 19F y 37) (Tabla 3) observándose que formaba menos biofilm que las cepas clínicas 19F e, incluso, que su cepa parental P192, también del mismo serotipo 19F (Fig. 24).

Viendo que los serotipos 19A y 19F formaban un buen biofilm, independientemente de la procedencia de la cepa, ampliamos el estudio con aislados de los serotipos 19B y 19C y sus transformantes P182 (19B) y P184 (19C) en la cepa de *S. pneumoniae* M11 (Tabla 3). Los serotipos 19B y 19C se comportaron como otros serotipos capsulares de *S. pneumoniae*, donde la cápsula impide o dificulta la formación de biofilm (Fig. 24).

3. LA MATRIZ EXTRACELULAR DE LOS BIOFILMES DE *S. PNEUMONIAE*

En un estudio previo, Moscoso y cols. (2006) mostraron unas imágenes de LTSEM en las que se podían observar algunos finos filamentos uniendo las células de neumococo en el biofilm. La obtención de nuevas imágenes durante el desarrollo de esta Tesis ha permitido poner de relieve la existencia de numerosas fibras que forman estructuras reticulares y que unen a los neumococos entre sí, lo que constituye una evidencia clara de la existencia de una matriz extracelular en los biofilmes de *S. pneumoniae* (Fig. 25).

3.1. Componentes de la matriz

En trabajos anteriores realizados en el laboratorio se analizó la presencia de ADN y proteínas en la matriz del biofilm neumocócico, mediante el tratamiento con DNasa I o enzimas proteolíticas (tripsina o proteinasa K), pudiéndose demostrar que ambos tipos de macromoléculas se encuentran formando parte de las EPS que constituyen la matriz y que son importantes tanto para la formación del biofilm como para su mantenimiento (Moscoso *et al.*, 2006). Nosotros nos hemos planteado usar nuevas herramientas experimentales para poder ampliar dichos estudios previos así como para tratar de identificar componentes adicionales de la matriz del biofilm neumocócico.

3.1.1. Ácidos nucleicos

Como ya queda dicho, al comenzar este trabajo ya se sabía que el ADN extracelular (ADN-e) era uno de los componentes de la matriz del biofilm neumocócico pero no se había conseguido visualizarlo ya que la mayoría de los fluorocromos que se usan en microscopía confocal para teñir el ADN son capaces de penetrar en la bacteria viva y, por consiguiente, no permiten diferenciar el ADN del interior celular del ADN-e. Por otra parte, otros fluorocromos como el bromuro de etidio y el yoduro de propidio, que no son capaces de penetrar más que en las bacterias con la membrana dañada (presumiblemente no viables), requieren, para poder visualizar el ADN-e, aumentar la sensibilidad del CLSM a muy altos niveles y, en consecuencia, es muy

difícil obtener imágenes de buena calidad (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Por el contrario, el DDAO, que posee unas excelentes propiedades fluorescentes y es estructu-

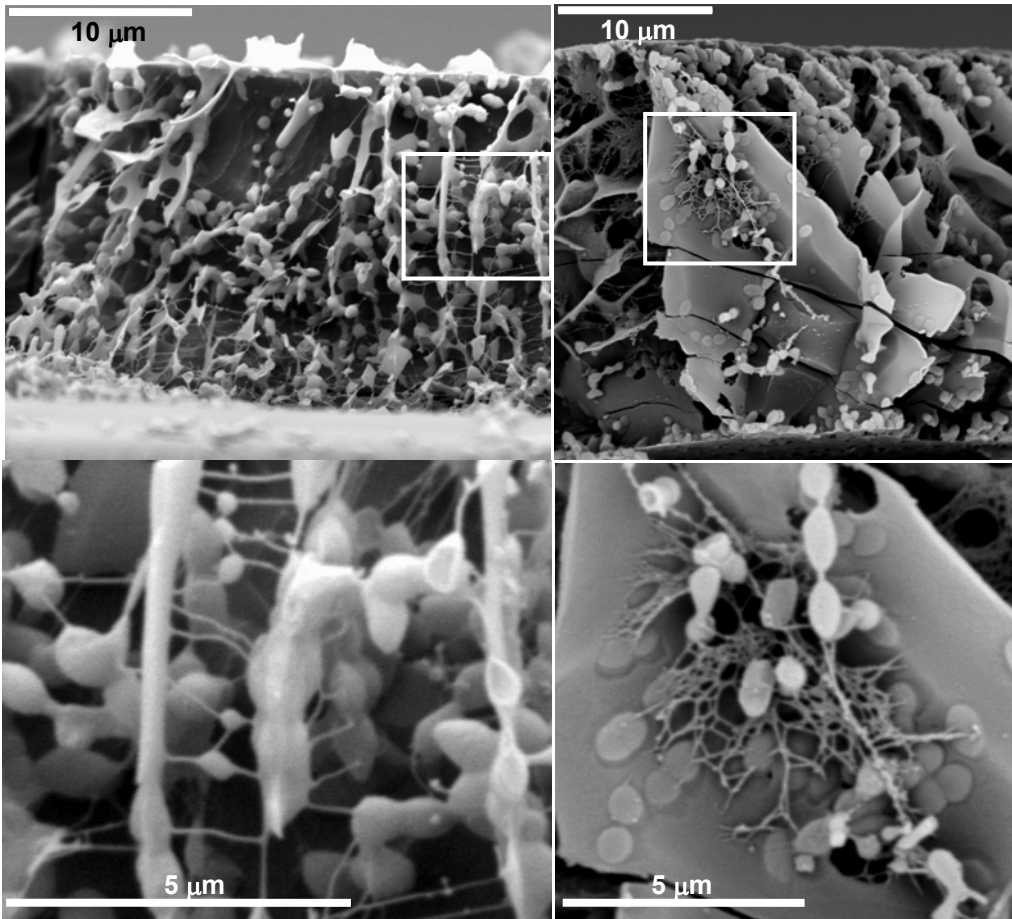


Figura 25. Imágenes de LTSEM mostrando el componente fibrilar de la matriz de un biofilm de la cepa R6 de neumococo formado sobre un cubreobjetos de vidrio. Las fotografías de la parte inferior corresponden a detalles aumentados de las regiones enmarcadas en la parte superior. Los cristales de hielo formados durante la criofijación, empujan a los solutos del medio que forman láminas eutécticas entre los cristales de hielo contiguos. Las estructuras tipo panal de abejas corresponden a dichas láminas.

RESULTADOS

ralmente similar al anaranjado de acridina, no penetra en las bacterias, es fácil detectar (Allesen-Holm *et al.*, 2006, Dominiak *et al.*, 2011) y, por consiguiente, resultaba idóneo para nuestro propósito. Como se muestra en la figura 26, el marcaje con DDAO permitió poner en evidencia la presencia de ADN-e sobre un fondo de fluorescencia verde (bacterias vivas) o rojo (bacterias muertas) de las células del biofilm. El ADN-e parece encontrarse presente en todas las capas del biofilm, desde la

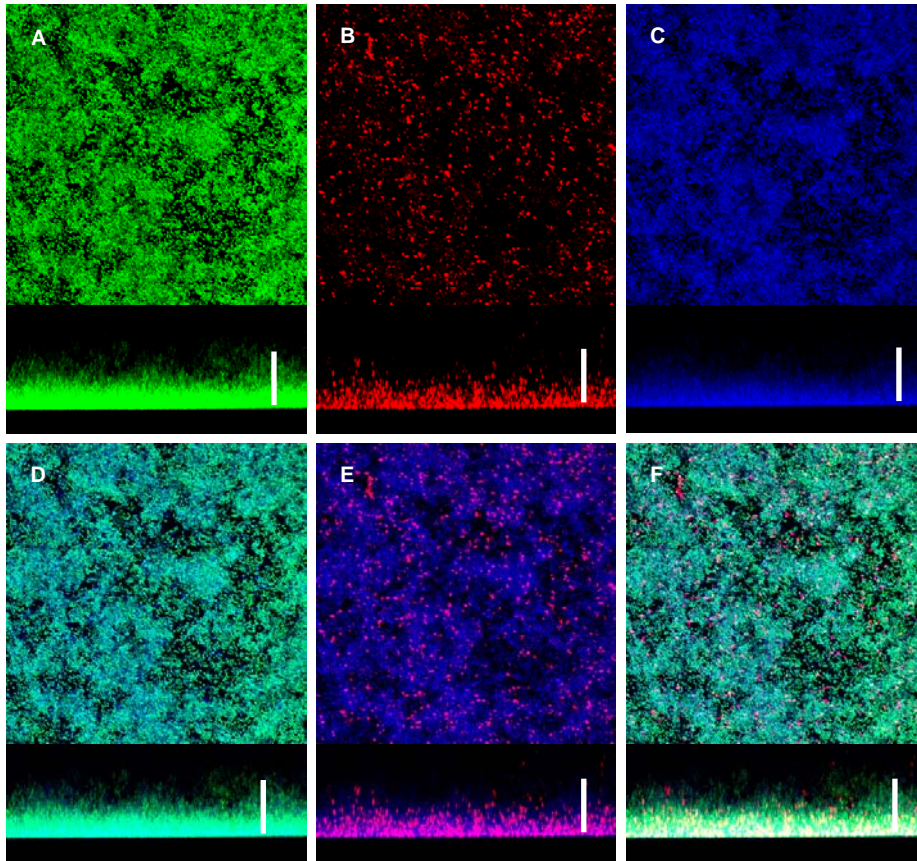


Figura 26. Presencia de ADN-e en los biofilmes de *S. pneumoniae* R6. Reconstrucción tridimensional horizontal (plano xy) y vertical (plano xz). Las células del biofilm se tiñeron con un kit de viabilidad bacteriana: células vivas (SYTO9, fluorescencia en verde; panel A) y células muertas (yoduro de propidio, fluorescencia en rojo; panel B) y el ADN-e con DDAO (fluorescencia en azul; panel C). Los paneles D y E corresponden a la superposición del canal azul con el canal verde o rojo, respectivamente. Panel F, superposición de los tres canales. Barra, 25 μm .

base hasta la superficie del mismo (Fig. 26). Por el contrario, tinciones llevadas a cabo de manera paralela sobre cultivos planctónicos no mostraron evidencia alguna de ADN-e (datos no mostrados).

En otra serie de experimentos se usó RNasa A para comprobar si en la matriz del biofilm neumocócico existe ARN extracelular (Fig. 27). Los resultados sugieren que el ARN es un componente minoritario en la matriz del biofilm.

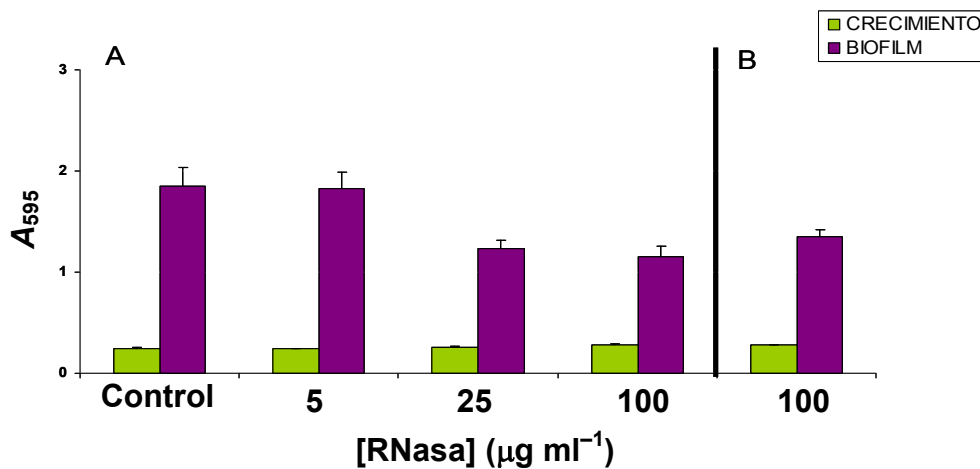


Figura 27. Ensayo de inhibición (A) y de disgregación (B) del biofilm de *S. pneumoniae* R6 con RNasa A y control sin enzima. Biofilm de 6 h a 34°C e incubación de 1 h a 37°C para el ensayo de disgregación.

3.1.2. Proteínas de la matriz

Como ya se dijo al comienzo de este capítulo, las proteínas extracelulares son importantes tanto para la formación como para el mantenimiento del biofilm neumocó-

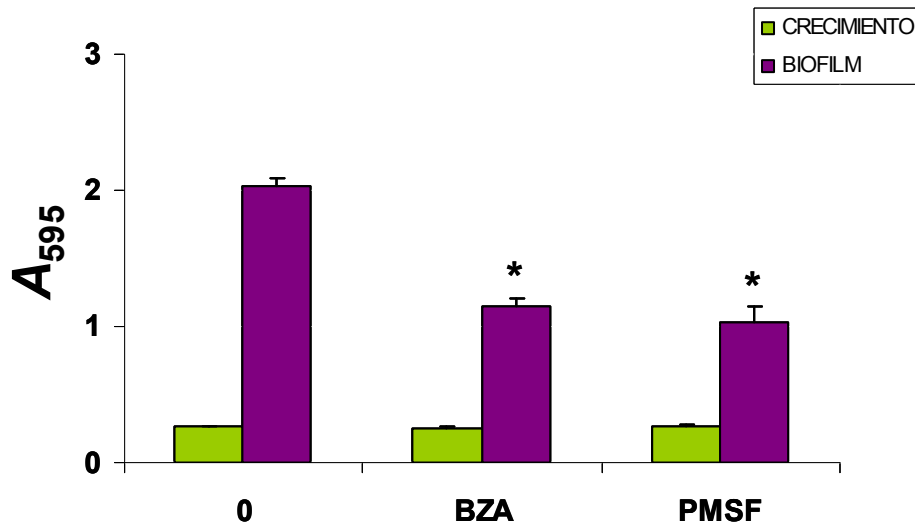


Figura 28. Ensayo de inhibición del biofilm de *S. pneumoniae* R6 con 1 mM de BZA o PMSF y control sin tratamiento (0). Biofilm de 6 h a 34°C. $P < 0.01$.

cico. Para determinar si alguna de estas proteínas tenía actividad proteásica se utilizaron dos inhibidores de serín proteasas, BZA y PMSF. Como se observa en la figura 28, la capacidad de la cepa R6 para formar biofilm disminuye sensiblemente (cerca del 50%) en presencia de uno u otro de los inhibidores sugiriendo que una o más serín-proteasas (diferentes de HtrA; véase apartado 1.2 de Resultados) son importantes para la formación del biofilm. Estos resultados contrastan con otros recientes obtenidos en *S. aureus* donde la formación de un buen biofilm se acompaña de la inhibición de la actividad serín-proteásica extracelular (Martí *et al.*, 2010).

3.1.3. Complejos ADN-proteína

Dada la evidencia de que el ADN-e y ciertas proteínas forman parte fundamental de la matriz del biofilm neumocócico, nos planteamos profundizar en este tema. Muy recientemente, se ha demostrado que, en *S. aureus*, la proteína denominada beta toxina (una esfingomielinasa) es secretada al medio (Huseby *et al.*, 2007) y se une fuertemente al ADN-e (esta unión permanece estable en 4 M NaCl); además, los

monómeros de proteína se unen entre sí covalentemente y forman una matriz nucleoproteica insoluble que promueve la formación de biofilmes tanto *in vitro* como *in vivo* (Huseby *et al.*, 2010). Sería concebible que, en neumococo, alguna o algunas proteínas de superficie pudieran desempeñar un papel similar. Dada la larga experiencia de nuestro laboratorio en la purificación de diversas CBPs, decidimos ensayar la posibilidad de que alguna de ellas pudiera ser capaz de unirse a ADN utilizando para ello un ensayo de migración en geles de agarosa en el que, la posible unión del ADN a alguna proteína, debería alterar el patrón de migración de aquel llegando, incluso, a impedirla (García *et al.*, 1983). Como control positivo de unión a ADN se utilizó lisozima de clara de huevo (HEWL) (Steinrauf *et al.*, 1999) y, como control negativo, BSA. Entre las diversas CBPs utilizadas (Fig. 29), pudo observarse que LytC y, en mucha menor medida, LytB y CbpF fueron capaces de unirse al ADN utilizado en el experimento, esto es, al plásmido pGL30 (Tabla 5). A la vista de estos resultados y del hecho de que LytC es una proteína abundante en el medio extracelular de los cultivos de neumococo (Eldholm *et al.*, 2009), decidimos caracterizar en mayor detalle algunas de las propiedades de la unión entre esta lisozima y el ADN.

En primer lugar, analizamos si LytC muestra algún tipo de requerimiento o especificidad por el ADN. Para ello, en primer lugar, se utilizaron ADNs cromosómicos de diversas especies bacterianas que diferían grandemente en su contenido en G+C. En concreto, se utilizaron los ADNs de *C. acetobutylicum* (28–31%), *S. pneumoniae* (39%), *A. calcoaceticus* (39%), *E. coli* (47–50%), *Azoarcus* sp. (62–68%) y *M. roseus* (73%). A pesar de estas diferencias y de tratarse de ADNs cromosómicos (como contraposición a la forma superenrollada de pGL30 usada en el experimento anterior), no se observaron diferencias notables en la capacidad de unión de LytC (Fig. 30). Además, pudimos observar que LytC se une tanto a ADN bicatenario como monocatenario y confirmar que dicha unión no depende en gran medida del tamaño del mismo (Fig. 31). Además, la digestión del complejo LytC-ADN con proteínaasa K permitió la recuperación del ADN en un estado aparentemente intacto. Como también se muestra en la figura 31, la unión del ADN y LytC parece depender de la presencia de Mg^{2+} dado que la adición de 10 mM EDTA (pero no de EGTA a la misma concentración) impedía la formación del complejo. En experimentos adicionales pudimos determinar, además, que el EDTA, a una concentración final de 50 mM, era incapaz de deshacer los complejos LytC-pGL30 ya formados (datos no mostrados).

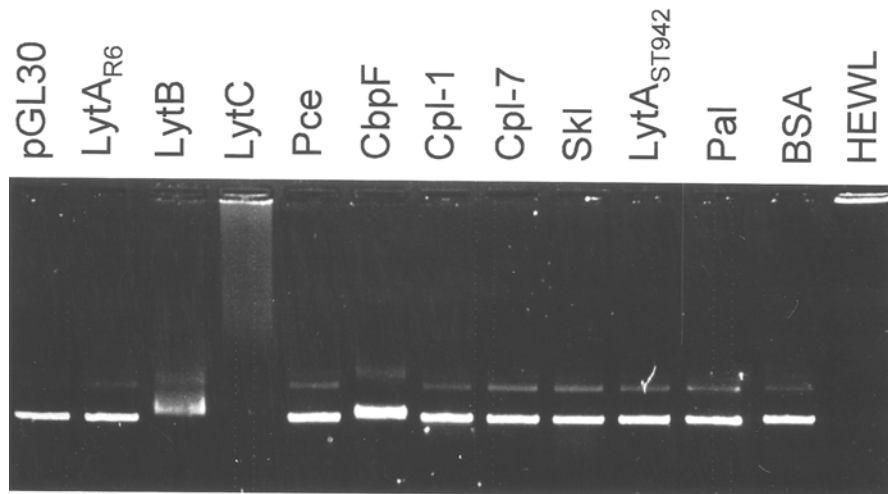


Figura 29. Unión de LytC, LytB y CbpF a pGL30. Las mezclas de las distintas proteínas indicadas (1 µg) y pGL30 (40 ng) se incubaron en tampón Tris-HCl (10 mM; pH 7.0) durante 1 h a 37°C y se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (0.7%). Como CBPs no bacterianas se usaron las enzimas fágicas Cpl-1, Skl y Pal. También se utilizó la lisozima Cpl-7, que no es una CBP. LytA_{R6} y LytA_{ST942} son dos alelos de LytA que difieren entre sí en cinco aminoácidos (Morales *et al.*, 2010). Como controles, se utilizaron BSA (control negativo) y HEWL (control positivo).

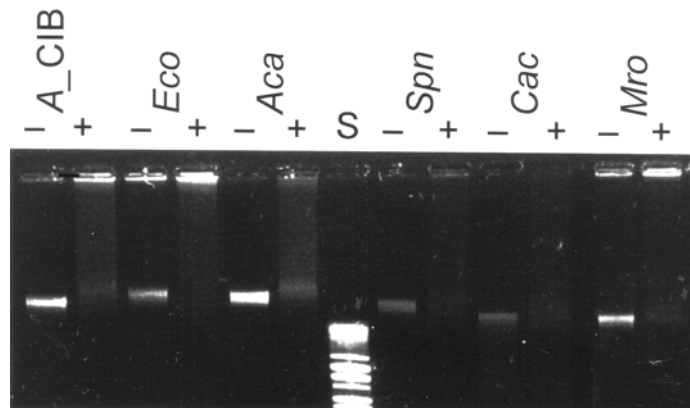


Figura 30. Unión de LytC a diferentes ADNs cromosómicos. Las mezclas de los distintos ADNs (0.1 µg) y LytC (2.6 µg) se incubaron y analizaron como se indica en la leyenda de la figura anterior. A_CIB, *Azoarcus* sp. CIB; *Eco*, *E. coli*; *Aca*, *A. calcoaceticus*; *Spn*, *S. pneumoniae*; *Cac*, *C. acetobutylicum*; *Mro*, *M. roseus*. Los signos + y – indican, respectivamente, adición o no de LytC; S, patrón de ADN de λ digerido con BstEII.

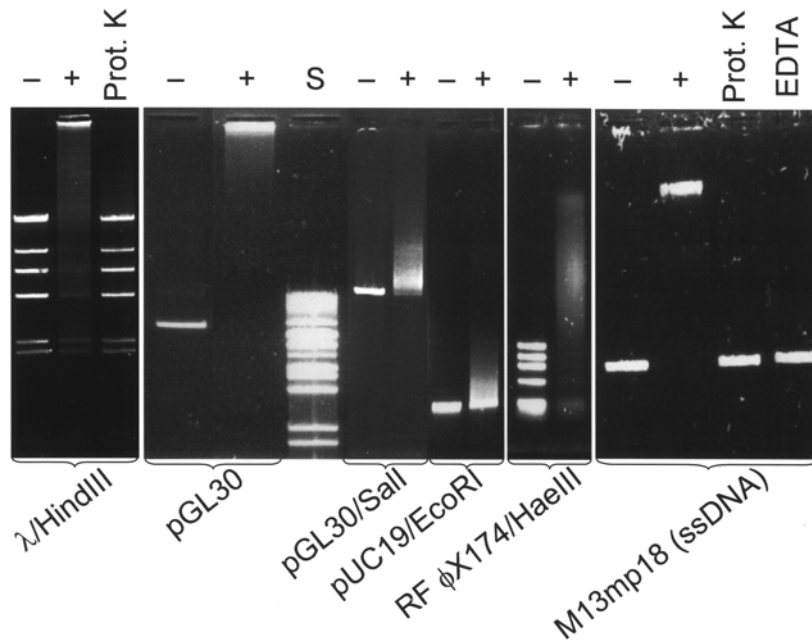


Figura 31. Unión de LytC a diferentes tipos de ADN. El ADN de λ digerido con HindIII (0.3 μg) fue incubado (+) o no (-) con LytC (8 μg) de igual forma que en los experimentos anteriores. Después de la unión, una parte fue tratada con proteinasa K (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; 15 min, 37°C). En experimentos similares, pero con 1 μg de LytC, se usaron la forma superenrollada de pGL30 (40 ng) o este mismo plásmido linealizado con Sall, el plásmido pUC19 digerido con EcoRI (40 ng), la forma replicativa del ADN de ϕX174 digerida con HaeIII (160 ng; 4 μg de LytC) o el ADN (monocatenario) de M13mp18 (40 ng). En este último caso, se incluye un experimento en el que la incubación de ADN y LytC tuvo lugar en presencia de 10 mM EDTA. S, patrón de ADN de λ digerido con BstEII.

En la figura 32 se muestra una serie de experimentos dirigidos a determinar las condiciones óptimas para la formación del complejo ADN-LytC. Como resumen de todos los resultados obtenidos, se puede afirmar que, para obtener la máxima retención del complejo en el pocillo del gel de agarosa, se requiere un $\text{pH} \leq 7.5$, una proporción LytC:ADN de, aproximadamente 25 (en peso), un tiempo de incubación ≥ 30 min y una temperatura de incubación de 37°C. La formación del complejo parece requerir un contenido en NaCl relativamente bajo (≤ 20 mM) y no parece verse afectada por la adición de cloruro de colina más allá del puro efecto salino (Fig. 33). No obstante, hay que resaltar el hecho de que, una vez que ha tenido lugar la for-

RESULTADOS

mación del complejo ADN-proteína, éste no se deshace por la adición de 1.5 M NaCl o 2% de cloruro de colina, lo que indica que la unión es bastante fuerte (datos no mostrados).

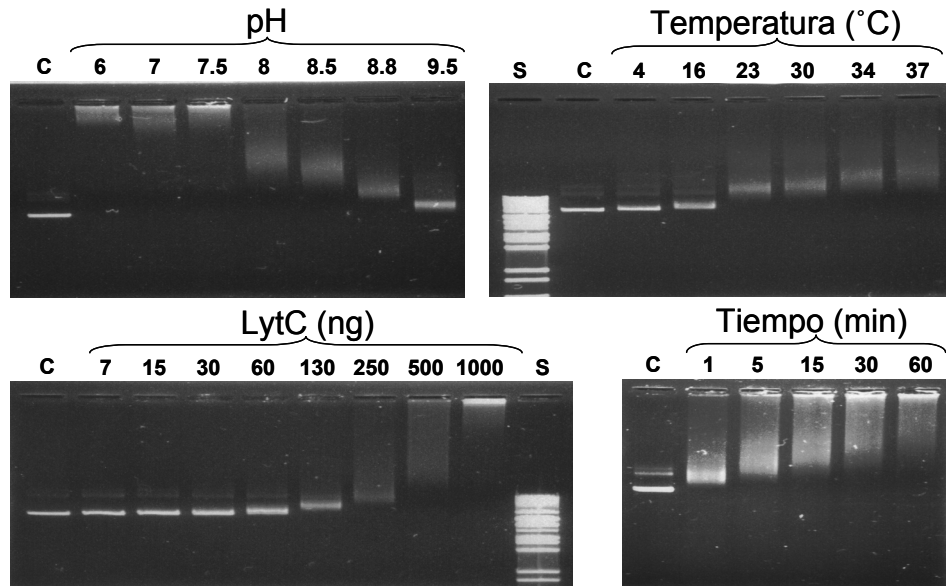


Figura 32. Unión de LytC y ADN en diferentes condiciones experimentales. En todos los experimentos se utilizaron 40 ng de pGL30. Cuando se analizó el efecto del pH, se añadió 1 μ g de LytC y la incubación tuvo lugar durante 1 h a 37°C en tampón Tris-HCl (10 mM) del pH indicado. Cuando se analizó el efecto de la temperatura, la incubación se llevó a cabo durante 1 h a la temperatura indicada en tampón Tris-HCl (10 mM; pH 8.5). Para analizar el efecto de la concentración de proteína (1 h de incubación a 37°C) o el tiempo de incubación se utilizó tampón Tris-HCl a pH 7.0. C, control de pGL30 sin LytC añadida. S, patrón de ADN de λ digerido con BstEII.

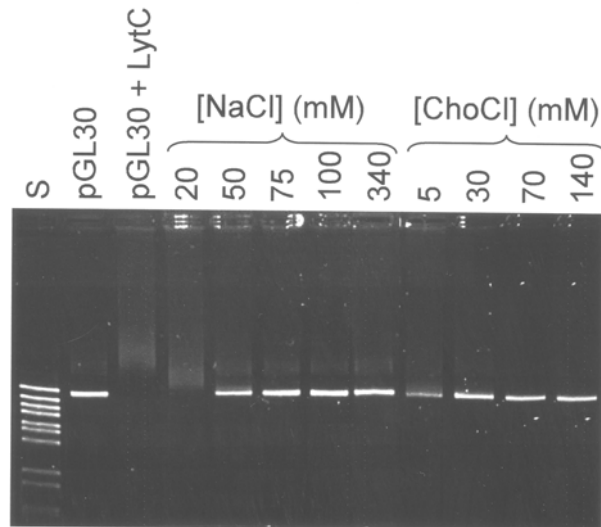


Figura 33. Unión de LytC y ADN en función de la fuerza iónica. El plásmido pGL30 (40 ng) fue incubado con LytC (1 μ g) en 10 mM Tris-HCl (pH 7.0) a 37°C durante 1 h con las adiciones indicadas. ChoCl, cloruro de colina. S, patrón de ADN de λ digerido con BstEII.

Puesto que CbpF ha sido identificado como un inhibidor de la actividad enzimática de LytC (Molina *et al.*, 2009) y, además, CbpF parece también unirse ligeramente al ADN, se llevó a cabo un experimento de unión ADN-LytC en presencia de diferentes cantidades de CbpF (Fig. 34). Se observó que CbpF es capaz de inhibir la formación del complejo LytC-ADN aunque, se pudo confirmar la existencia, ya señalada anteriormente (Fig. 29), de un cierto grado de afinidad entre CbpF y el ADN.

Los complejos LytC-ADN fueron observados al microscopio electrónico comprobándose la formación de agregados de proteína que se encuentran unidos al ADN (Fig. 35).

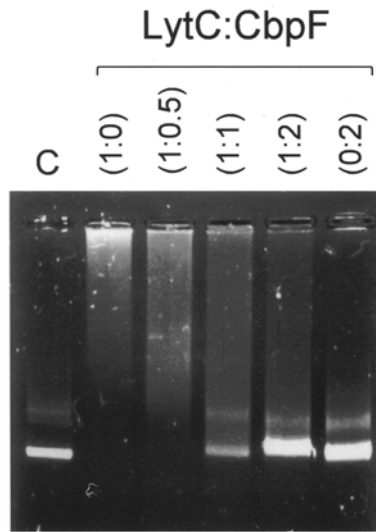


Figura 34. CbpF inhibe la formación del complejo ADN-LytC. En cada experimento se usó pGL30 (40 ng), LytC (1 μ g) y las cantidades correspondientes de CbpF (entre 0.5 y 2 μ g). La reacción de unión se realizó en tampón Tris-HCl (10 mM, pH 7.0) durante 1 h a 37°C. C, control de pGL30 sin adiciones.

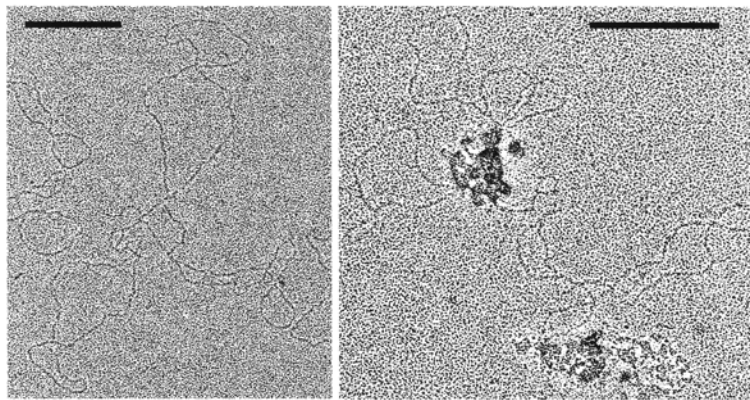


Figura 35. Formación de complejos LytC-ADN. A la izquierda se muestra el plásmido pGL30 en ausencia de proteína mientras que a la derecha se observan acúmulos de proteína que engloban al ADN. Barra, 200 nm.

3.1.4. Exopolisacáridos

Aunque la existencia de exopolisacáridos entre los componentes de las EPS de la matriz ha podido ser demostrada en la mayoría de los biofilmes estudiados, hasta el momento no hay ninguna evidencia de tales compuestos en el caso de neumococo. Con objeto de tratar de obtener información sobre la existencia o no de polisacáridos en los biofilmes de *S. pneumoniae* se utilizaron varias aproximaciones experimentales complementarias.

En primer lugar, se utilizó metaperyodato sódico (NaIO_4) que es un compuesto oxidante que hidroliza los enlaces carbono-carbono cuando ambos átomos de carbono poseen un átomo de oxígeno, ya sea en forma de grupo hidroxilo o carbonilo. La oxidación tiene lugar tanto en polisacáridos como en glicoproteínas. Aunque ciertos azúcares son más susceptibles a la oxidación que otros, se sabe que, a concentraciones superiores a 10 mM, el NaIO_4 es capaz de oxidar una gran variedad

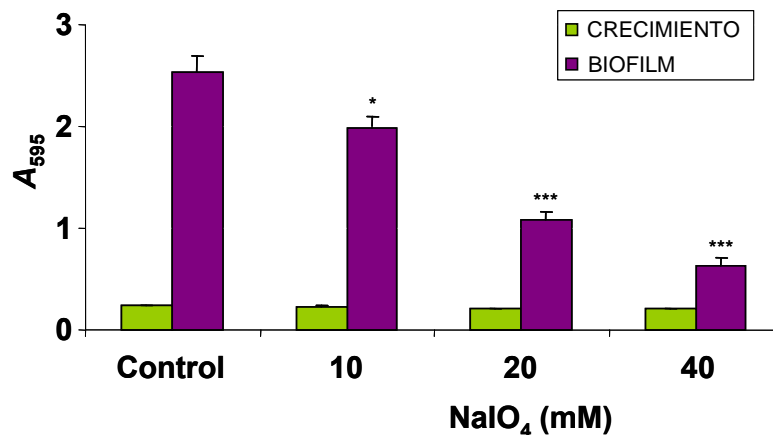


Figura 36. Ensayo de disgregación del biofilm de *S. pneumoniae* R6 con NaIO_4 . Biofilmes de 6 h a 34°C y disgregación de 2 h a 37°C. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

de monosacáridos, incluyendo galactosa y glucosa (<http://www.piercenet.com/instructions/2161161.pdf>). Por estas razones, el NaIO_4 ha sido muy utilizado para de-

terminar la presencia de polisacáridos en las EPS de biofilmes formados por diferentes especies bacterianas ya que si, un tratamiento del biofilm con este compuesto produce la disgregación del mismo, es una buena indicación de la presencia de un polisacárido como componente de la matriz. Así, por ejemplo, experimentos de este tipo han detectado la existencia de polisacáridos en biofilmes de una variedad de microorganismos (Gawande *et al.*, 2008), incluyendo *E. coli* (Wang *et al.*, 2004), *S. epidermidis* (Stevens *et al.*, 2009), *S. aureus* (Seidl *et al.*, 2008), pero no en *Staphylococcus lugdunensis* (Frank y Patel, 2007).

El NaIO_4 fue capaz de disgregar el biofilm de neumococo, como se muestra en la figura 36. De hecho, hasta un 75% del biofilm neumocócico pudo ser eliminado después de un tratamiento de 2 h a 37°C con 40 mM de NaIO_4 , sugiriendo la existencia de algún tipo de componente polisacárido en las EPS del biofilm.

La dispersina B (DispB) es una glicósido hidrolasa producida por la bacteria oral Gram-negativa *Aggregatibacter* (anteriormente, *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* que degrada específicamente poli- β -1,6-GlcNAc (Ramasubbu *et al.*, 2005, Manuel *et al.*, 2007). Este polisacárido es conocido como PIA (*polysaccharide intercellular adhesin*) en *Staphylococcus* y PGA en *E. coli* y, entre especies, existen diferencias tanto en el grado de desacetilación de los residuos de GlcNAc como en la presencia de sustituyentes O-acetilados. Se ha demostrado que esta enzima inhibe, disgrega, o ambos, los biofilmes de, entre otras bacterias, *S. epidermidis* y *S. aureus* (Izano *et al.*, 2008), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Izano *et al.*, 2007), *E. coli* (Itoh *et al.*, 2005) y *Bordetella* (Parise *et al.*, 2007). Usando como control positivo la cepa 15981 de *S. aureus*, cuyo biofilm se disgregaba en un 85% por acción de DispB, se pudo determinar que, por el contrario, los biofilmes de neumococo no eran alterados por la acción de la enzima (datos no mostrados). Como comprobación adicional, usamos un anticuerpo policlonal anti-PIA (Tabla 7) (Joyce *et al.*, 2003) y aunque mediante *dot-blot*, el suero anti-PIA fue capaz de reconocer el exopolisacárido en un biofilm de *S. aureus* 15981, no se obtuvo resultado positivo alguno en el caso de los biofilmes de neumococo.

Además de las aproximaciones experimentales mencionadas más arriba, se utilizó CLSM para tratar de avanzar en el conocimiento de los polisacáridos de la matriz y la composición, siquiera parcial, de los mismos. Para ello, se utilizaron tanto el calcoflúor como diversas lectinas (proteínas que se unen específicamente a determinados azúcares) (Tabla 7). El calcoflúor es un fluorocromo que se une específicamente a polisacáridos que contienen azúcares unidos por enlaces $\beta(1\rightarrow3)$ y

$\beta(1\rightarrow4)$, como la quitina o la celulosa (Harrington y Hageage, 2003, Plášek y Hošková, 2010). La quitina es un polisacárido compuesto por unidades de GlcNAc unidas por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ mientras que la celulosa es un homopolisacárido de Glc que contiene desde varios cientos hasta varios miles de residuos de β -Glc, unidos asimismo por enlaces $\beta(1\rightarrow4)$. Como se muestra en la figura 37, el calcoflúor se unió efectivamente a la matriz del biofilm neumocócico, incluso en regiones carentes de bacterias, indicando que el exopolisacárido de la matriz del biofilm de neumococo podría contener β -glicanos. Además, el polisacárido al que se une el calcoflúor se encuentra desde las capas más profundas del biofilm hasta las más superficiales, como puede observarse en las reconstrucciones tridimensionales verticales (Fig. 37, paneles F y G). Este ensayo también se realizó, en las mismas condiciones, con un cultivo planctónico, no observándose fluorescencia alguna correspondiente al calcoflúor. Asimismo, se realizó un experimento de competición tiñendo los biofilmes con calcoflúor en presencia de un α -polisacárido (pululano) o un β -polisacárido (celulosa) añadido externamente (25 mg ml^{-1}), observándose que el fluorocromo sólo era capaz de unirse a las EPS del biofilm en el primero de los dos casos (Fig. 38). Este tipo de ensayo nos permite comprobar que el calcoflúor se une específicamente a β -polisacáridos y corrobora que, en la matriz del biofilm de neumococo, hay un exopolisacárido de esta naturaleza.

Las lectinas son proteínas que se unen específicamente a un carbohidrato de forma reversible, sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos reconocidos. Nosotros hemos usado cuatro lectinas diferentes: ConA, PNA, SBA, WGA (Sharon, 2007) conjugadas con diversos fluorocromos del tipo Alexa flúor (Tabla 7) para poder visualizarlas en el CLSM e identificar, de esta manera, los posibles carbohidratos presentes en la matriz del biofilm de neumococo. Como se muestra en la figura 39, tanto SBA como WGA se unieron al biofilm de neumococo; ambas lectinas co-localizan con las bacterias pero, de manera similar a lo observado para el calcoflúor, también se observaron zonas aparentemente libres de bacterias en las que sí puede observarse marcaje con una, otra o ambas lectinas. La lectina SBA se une a residuos de α - y β -GalNAc así como, en general, a residuos galactopiranosil mientras que WGA reconoce residuos de GlcNAc y ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac). Ni PNA ni ConA, que reconocen, respectivamente, residuos terminales de β -galactosa y α -manopiranosil/ α -glucopiranosil, se unieron a la matriz del biofilm de *S. pneumoniae* (datos no mostrados). Todo ello indica que en

RESULTADOS

la matriz del biofilm de neumococo hay residuos accesibles de α - y/o β -GlcNAc así como de GlcNAc y/o Neu5Ac.

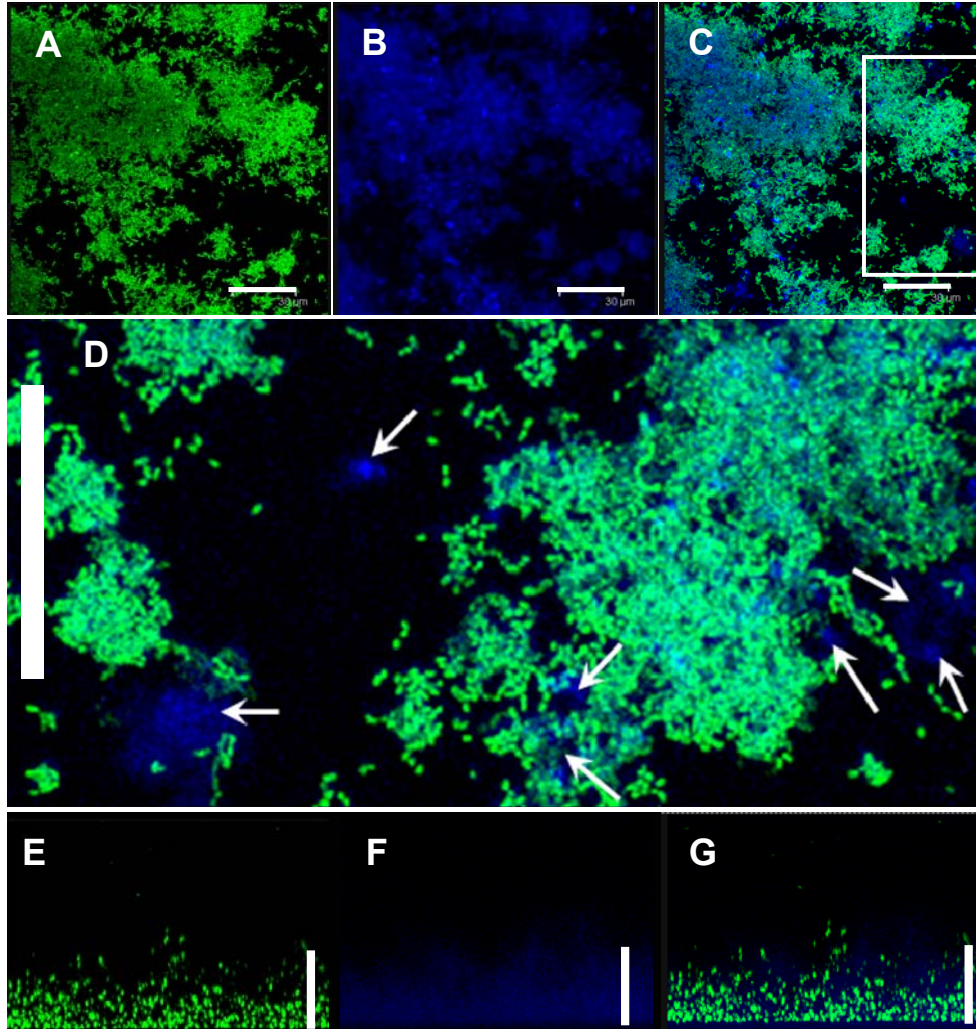


Figura 37. Unión del calcoflúor al biofilm de *S. pneumoniae* P040. Reconstrucciones tridimensionales horizontales (plano xy). Las bacterias, que contienen el gen de la GFP clonado en un plásmido (Tabla 3), se visualizan en verde (A) y, en azul, la tinción con calcoflúor (B). En el panel C se muestra la superposición de ambas imágenes y, en D, una ampliación de la zona enmarcada con flechas señalando algunas zonas carentes de células pero teñidas con calcoflúor. Barra, 30 μm . Paneles E, F y G, reconstrucciones tridimensionales verticales (plano xz). Al igual que en D, en el panel G también pueden observarse zonas teñidas con calcoflúor pero carentes de células. Barras, 25 μm .

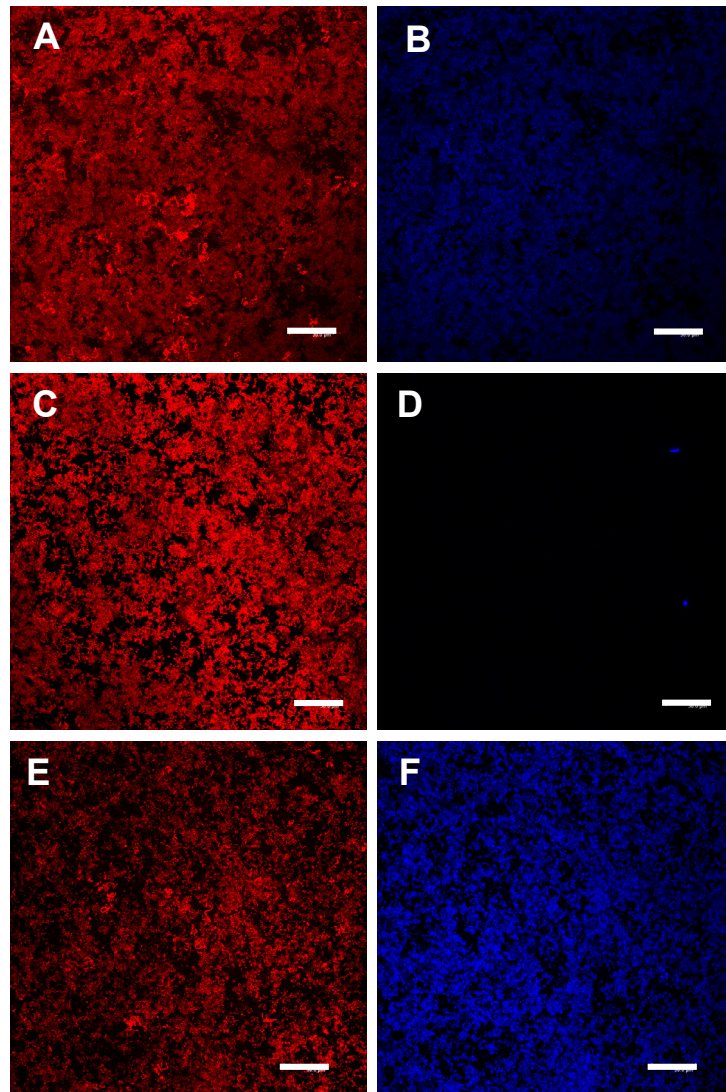


Figura 38. Ensayo de unión y bloqueo del calcoflúor al biofilm de *S. pneumoniae* R6. Reconstrucciones tridimensionales horizontales (plano xy). Las bacterias se tiñeron con el fluorocromo SYTO 59 y se visualizaron con fluorescencia en rojo (paneles A, C y E) En azul, se muestra la tinción del polisacárido con el calcoflúor sin tratamiento o en presencia de celulosa o pululano (paneles B, D y F, respectivamente). Barra, 30 μm .

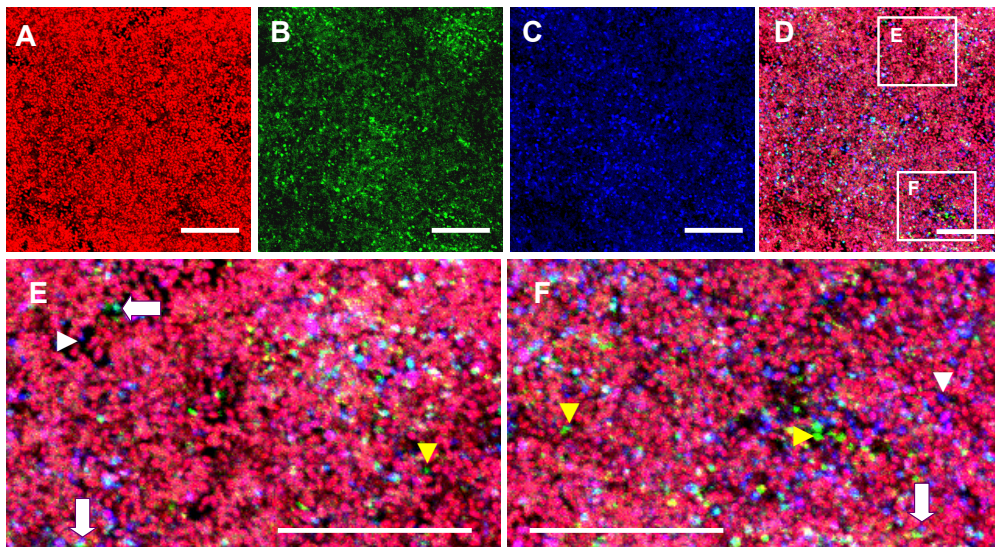


Figura 39. Unión de las lectinas SBA y WGA al biofilm de *S. pneumoniae* R6. Reconstrucciones tridimensionales horizontales (plano *xy*). Panel A, células bacterianas teñidas con el fluorocromo SYTO 60. Panel B, tinción con la lectina SBA (aglutinina de soja) conjugada con Alexa flúor 488. Panel C, tinción con la lectina WGA (aglutinina de germen de trigo) conjugada con Alexa flúor 647. En D, se muestra el plano *xy* de la tinción conjunta de la bacteria y ambas lectinas. En la parte inferior (paneles E y F) se muestran detalles ampliados del panel D, zona E (panel E) y zona F (panel F). Con triángulos de color blanco o amarillo se indican, respectivamente, zonas de tinción con WGA (azul oscuro), o SBA (verde) y, con flechas blancas, tinción con ambas lectinas. Barra, 30 μ m.

A la vista de los resultados obtenidos, decidimos utilizar conjuntamente una combinación de WGA y calcoflúor en experimentos de CLSM. En la figura 40 se puede observar que en los biofilmes de neumococo existen zonas donde sólo se ve bacteria marcada (en verde; SYTO 9), otras libres de bacterias donde sólo hay marcaje con el calcoflúor (en azul) o la lectina y, finalmente, otras regiones donde sólo se observa marcaje con la lectina (en rojo). Estos datos sugieren que la lectina WGA y el calcoflúor se están uniendo a componentes diversos de la matriz del biofilm aunque, en ocasiones, varios de los marcajes pueden coincidir produciendo un color amarillo. Resulta interesante remarcar que, utilizando cultivos planctónicos, sólo se observó fluorescencia mediante la tinción con SYTO 9 (datos no mostrados), lo que

muestra la especificidad de las lectinas y del calcoflúor por componentes polisacáridos de la matriz del biofilm.

En la figura 40 y, a mayor aumento, en la figura 41 se puede observar cómo, además de envolver a las células bacterianas, el marcaje con lectinas, calcoflúor o ambos aparece en zonas donde no hay bacterias. Si nos fijamos en el plano xz (que nos indica el espesor del biofilm) de la figura 40, se puede apreciar cómo el marcaje con calcoflúor y WGA está presente en todo el espesor del biofilm de neumococo, incluso, en las zonas más superficiales del mismo donde ya no parece haber bacterias.

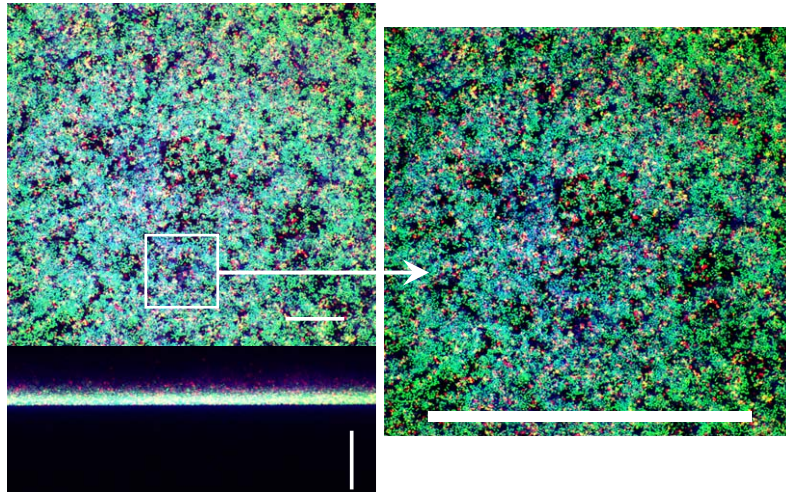


Figura 40. Ensayo de unión de la lectina WGA y el calcoflúor al biofilm de *S. pneumoniae* R6. Reconstrucción tridimensional horizontal (plano xy) y vertical (plano xz). Se observan las bacterias teñidas con el fluorocromo SYTO 9 (verde), la unión de la lectina WGA conjugada con Alexa 647 (rojo) y del calcoflúor (azul). Barra, 30 μm .

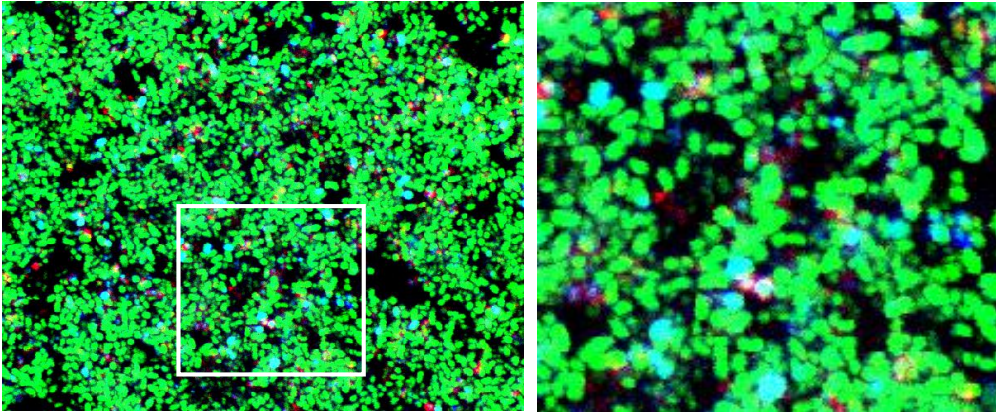


Figura 41. Ensayo de unión de la lectina WGA y el calcoflúor al biofilm de *S. pneumoniae* R6. Reconstrucción tridimensional horizontal (plano *xy*) con zoom 2×. Las condiciones de marcaje fueron idénticas a las indicadas en el pie de la figura 40.

Para corroborar la especificidad del reconocimiento por parte de las lectinas, se llevaron a cabo experimentos en los que los biofilmes fueron incubados con WGA o SBA en presencia de D-galactosa (25 mg ml^{-1}) o GlcNAc (25 mg ml^{-1}), respectivamente. En estas condiciones, no se observó marcaje fluorescente de los biofilmes debido a la unión previa de la lectina al azúcar correspondiente (datos no mostrados).

Como complemento a la identificación de los azúcares presentes en las EPS mediante el uso de lectinas, decidimos utilizar enzimas hidrolíticas de polisacáridos para determinar su efecto sobre los biofilmes de *S. pneumoniae*. De las enzimas hidrolíticas probadas, la quitinasa es la que más disgregó el biofilm (90%) seguida de la hemicelulasa y la celulasa ($\approx 80\%$) y, por último, la xilanasas, quitosanasa, dextranasa y α -amilasa (65%–37%) (Fig. 42). Hay que tener en cuenta que la hemicelulasa es un complejo enzimático que posee, entre otras, xilanasas y mananasas y, como se observa en la figura 42, usando únicamente la xilanasas sola se obtiene una disgregación del biofilm de hasta un 65%. Con otras enzimas hidrolíticas ensayadas, como la alginato liasa que disgrega el biofilm de *P. aeruginosa* (Boyd y Chakrabarty, 1994), no se observó ninguna disgregación del biofilm de *S. pneumoniae* (dato no mostrado). La quitinasa o poli- β -(1,4)-*N*-acetilglucosaminidasa (Felse y

Panda, 1999), es una enzima producida por las bacterias para digerir la quitina y así utilizarla como fuente de carbono y energía. La quitina es un polisacárido compuesto de unidades de GlcNAc, unidas entre sí con enlaces β -(1,4) de la misma forma que las unidades de glucosa componen la celulosa. Así, podría pensarse en la quitina como en una celulosa con el grupo hidroxilo de cada monómero reemplazado por un grupo de acetilamina. Esto permite un incremento de los enlaces de hidrógeno con los polímeros adyacentes, dándole al material una mayor resistencia.

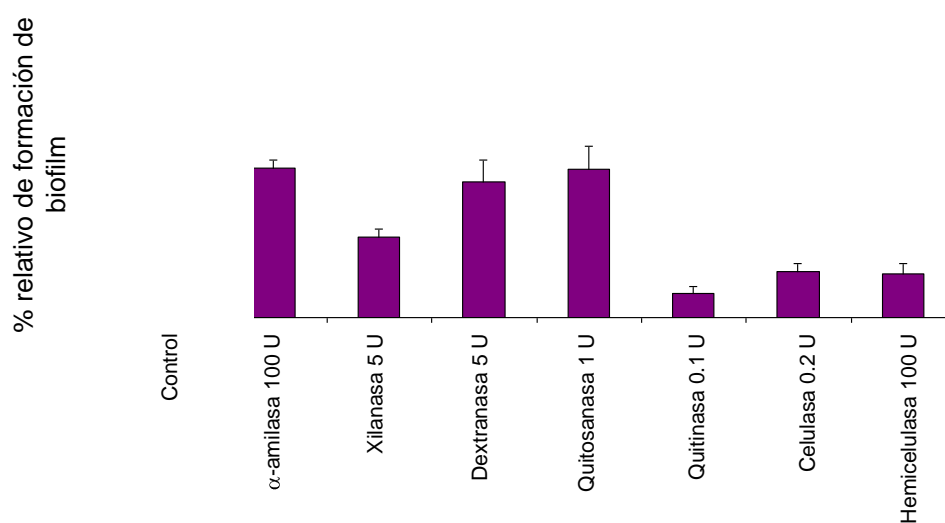


Figura 42. Ensayo de disgregación del biofilm de *S. pneumoniae* R6. Biofilm de 14 h a 34°C y disgregación de 1 h a 20°C (α -amilasa), 30°C (xilanasa), 37°C (dextranasa, quitosanasa, quitinasa y celulasa) y 40°C (hemicelulasa). Salvo en el caso de la α -amilasa, que fue ensayada en tampón Tris-HCl (50 mM, pH 7.0), el resto de las enzimas se ensayaron en tampón de citrato sódico (50 mM) ajustado a pH 4.6 (xilanasa y hemicelulasa), 5.0 (quitosanasa y celulasa) o 6.0 (dextranasa y quitinasa). Una unidad (U) de enzima se define como la cantidad necesaria para liberar 1 μ mol de azúcar min^{-1} . En el caso de la hemicelulasa, 1 U se define como la cantidad de enzima que produce un cambio relativo de una unidad en la viscosidad de una solución de goma de algarrobo (2 mg ml^{-1}) en un periodo de tiempo de 5 min (Institute of Medicine of the National Academies, 2003).

Como se observa en la figura 43, la quitinasa y la quitosanasa muestran un claro efecto disgregador del biofilm neumocócico, siendo esta actividad aún más patente con la quitinasa (Fig. 43D). Hay que hacer notar el hecho de que, a pH 5.0 (el utili-

RESULTADOS

zado para la quitosanasa), la mayoría de las bacterias mueren (se ven en rojo en la figura) pero la disgregación del biofilm no tiene lugar (Fig. 43B).

Salvo en el caso de la α -amilasa, que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4- α -D-glucosídicos en polisacáridos que contienen 3 o más enlaces α -(1 \rightarrow 4) que unen residuos de glucosa y la dextranasa, que sólo producen un efecto limitado sobre la integridad del biofilm, el resto de las enzimas que disgregaron eficazmente el biofilm neumocócico, catalizan la hidrólisis de enlaces β -(1 \rightarrow 4), lo cual apoya los resultados ya comentados obtenidos con el calcoflúor.

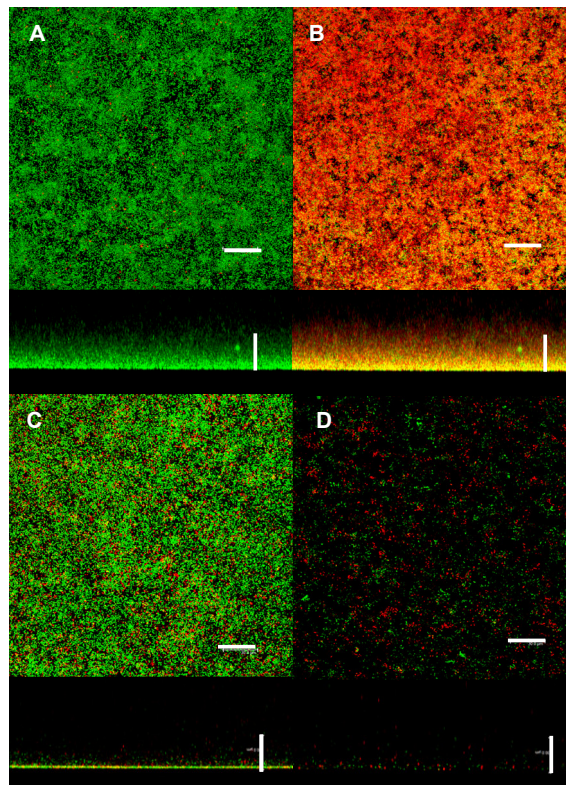


Figura 43. Ensayo de disgregación del biofilm de *S. pneumoniae* R6. Biofilmes de 6 h a 34°C y disgregación de 1 h a 30°C con 1 U de quitosanasa (panel C) o 0.1 U de quitinasa (panel D). Panel A, control sin tratamiento. Panel B, biofilm control incubado a pH 5.0 (tampón citrato sódico, 50 mM). Reconstrucción tridimensional horizontal (plano xy) y vertical (plano xz). Visualizamos las células bacterianas teñidas con el *kit* de viabilidad: bacterias viables (fluorescencia en verde) y bacterias no viables (fluorescencia en rojo). Barra 30 μ m.

3.2. Búsqueda de genes implicados en la síntesis o degradación del exopolisacárido de la matriz del biofilm

3.2.1. Búsqueda de genes implicados en la síntesis del EPS

La base de datos CAZy (*Carbohydrate Active enZYmes*) contiene un listado de familias de módulos catalíticos y de unión a carbohidratos (dominios funcionales) de enzimas que degradan, modifican o crean enlaces glicosídicos (<http://www.cazy.org/Home.html>) (Cantarel *et al.*, 2009). En concreto, CAZy incluye 5 familias de proteínas entre las cuales hay 4 familias enzimáticas [glicosido hidrolasas (GHs), glicosiltransferasas (GTs), polisacárido liasas (PLs), carbohidrato esterasas (CEs)] y una de módulos de unión a carbohidratos (CaBMs). Las GHs (EC 3.2.1.-), también denominadas glicosidasas y glicosil hidrolasas, catalizan la hidrólisis del enlace glicosídico entre dos o más azúcares o entre un azúcar y otra parte de la molécula no glicosídica. Las GTs (EC 2.4.x.y) catalizan la transferencia de la parte glicosídica de moléculas donadoras activadas a moléculasceptoras específicas, formando enlaces glicosídicos. Las PLs (EC 4.2.2.-) rompen polisacáridos que contienen ácidos urónicos mediante un mecanismo de β -eliminación generando un residuo de ácido hexenurónico insaturado y un nuevo extremo reductor. Por su parte, las CEs catalizan la *O*- o *N*-desacetilación de azúcares sustituidos. Los CaBMs se definen como secuencias contiguas de aminoácidos de una enzima de las antes mencionadas, que poseen un plegamiento particular con capacidad de unirse a carbohidratos.

Utilizando la información incluida en la base de datos CAZy sabemos que, la cepa D39 de neumococo contiene, al menos, 72 genes (o fragmentos de los mismos) que podrían codificar proteínas con actividad sobre azúcares, aunque la función de muchas de ellas no ha sido confirmada experimentalmente. En la Tabla 15, se detallan 61 de estos genes, su equivalencia entre las cepas R6, D39 y TIGR4, la familia a la que pertenecen las proteínas correspondientes y los datos correspondientes a su posible actividad enzimática.

RESULTADOS

Tabla 15. Algunas proteínas de neumococo con posible actividad sobre azúcares

Proteína			Familia	Comentario ^d
R6 (Spr)	D39 (SPD_)	TIGR4 (SP_)		
0057	0063 (StrH)	0057	GH20	β -N-acetilglucosaminidasa
0059	0065 (BgaC)	0060	GH35	β -galactosidasa C
0091	0098	0102	GT2	–
0096	0104	0107	CaBM50	Contiene un dominio LysM
0135	0138	0133	GT4	–
0136	0139	0136	GT2	–
0244	0247	0265	GH1	–
0247	0250 (SpuA)	0268	CaBM41, CaBM48, GH13	Pululanasa
0276	0277 (BglA-1)	0303	GH1	6-P- β -glucosidasa
0284	0285	0312	GH31	–
0286	0287 (HysA) ^a	0314	PL8	Hialuronato liasa (hialuronidasa)
0292	0294	0322	GH88	Glucuronil hidrolasa
0310	0311 (DexB)	0342	GH13	Glucán 1,6- α -glucosidasa
0328	0335 (Eng) ^b	0368	CaBM32, GH101	<i>Endo</i> - α -N-acetilgalactosaminidasa
0329	0336 (Pbp1A)	0369	GT51	PBP 1A
0424	0427 (LacG-1)	0477	GH1	6-P- β -galactosidasa
0440	0444 (EndoD)	0498	CaBM32, GH85	<i>Endo</i> - β -N-acetilglucosaminidasa
0506	0503 (BglA-2)	0578	GH1	6-P- β -glucosidasa
0539	0534 (EstA)	0614	CE1	Tributirina esterasa
0565	0562 (BgaA)	0648	GH2	β -galactosidasa A
0604	0599 (MurG)	0689	GT28	UDP-GlcNAc–MurNAc (pentapéptido) pirofosforil-undecaprenol GlcNAc transferasa
0785	0778	0882	CE1	–
0867	0853 (LytB)	0965	GH73	<i>Endo</i> - β -N-acetilglucosaminidasa
0890	0873	0987	GH25	–
0930	0912 (PvaA)	1026	GH23	<i>Pneumococcal vaccine antigen A</i>
0948	0927 (NpiT)	NA	CaBM34, GH13	Neopululanasa
0981	0960 (CpoA)	1075	GT4	galactosil-glicosil diacilglicerol sintasa
0982	0961	1076	GT4	α -monoglucosil diacilglicerol sintasa
1025	1002 (PulA)	1128	CaBM4, CaBM48, GH13	Pululanasa, tipo I
1029	1005 (GlgB)	1121	CaBM48, GH13	enzima ramificante de 1,4- α -glucano
1032	1008 (GlgA)	1124	GT5	Sintasa de glucógeno/almidón
1069	1046 (LacG-2)	1184	GH1	6-P- β -galactosidasa
1223	1199	1365	GT2	–
1224	1200	1366	GT4	–
1239	1215 (Amy)	1382	GH13	α -amilasa
1333	1309 (PgdA)	1479	CE4	Desacetilasa de GlcNAc del peptidoglicano
1431	1403 (LytC)	1573	GH25	Lisozima
1459	1431	1606	GT2	–

1498	1467	1654	GH95	–
1531	1499 (NanB)	1687	CaBM40, GH33	Neuraminidasa B
1536	1504 (NanA)	1693	CaBM40, GH33	Neuraminidasa A
1538	1506	1695	CE7	Acetil xilán esterasa
1568	1534 (ScrB)	1724	GH32	Sacarosa-6-P hidrolasa
1617	1582	1795	GH32	Sacarosa-6-P hidrolasa
1652	1617	1833	GHnc ^c	Proteína de superficie
1698	1663 (TreC)	1883	GH13	α , α -fosfotrehalasa
1709	1673 (GtfA)	1894	GH13	Sacarosa fosforilasa
1713	1678 (Aga)	1898	GH36	α -galactosidasa
1823	1821 (Pbp2A)	2010	GT51	PBP 2A
1833	1830	2021	GH1	–
1867	1866 (NagG)	2056	CE9	GlcNAc-6-P desacetilasa
1909	1925 (Pbp1B)	2099	GT51	PBP 1B
1916	1932 (MalP)	2106	GT35	Maltodextrina fosforilasa
1917	1933 (MalQ)	2107	GH77	4- α -glucanotransferasa
1949	1969	2141	GH20	–
1951	1971	2143	GH38	–
1952	1972	2144	GH125	–
1953	1973	2145	GH92	α -1,2-manosidasa
1954	1974	2146	GH29	–
1965	1987	2159	CaBM47, GH98	Proteína relacionada con fucolectina
1966	1988	2160	GH95	–

^a También denominada SpnHL (Yadav *et al.*, 2009) y Hyal (Joshi *et al.*, 2009).

^b También denominada EngSpn (Koutsoulis *et al.*, 2008) y SpGH101 (Willis *et al.*, 2009).

^c Familia de GHs no especificada.

^d La función predicha corresponde a la anotada en la secuencia genómica de la cepa D39 con algunas actualizaciones.

Ante la imposibilidad de inactivar de manera sistemática todos los genes indicados en la Tabla 15, se seleccionaron 9 de ellos a los que se añadieron dos genes más (*spr0092* y *spr1655*). El gen *spr0092* (también denominado *capD*) aparece anotado como responsable de la síntesis de una proteína posiblemente implicada en la síntesis de CPS de tipo 1 mientras que *Spr1655* aparece anotada como una posible GT. Por otra parte, resulta interesante resaltar que, como se muestra en la figura 44, *Spr0091* (385 aminoácidos) parece ser una proteína de membrana ya que posee tres dominios transmembranales predichos y muestra una identidad del 24% (similitud 49%; $E = 10^{-14}$) con *IcaA* de *S. aureus* (412 aminoácidos) y del 26% (similitud 41%; $E = 10^{-13}$) con *PgaC* de *E. coli* (441 aminoácidos) que son las poli- β -1,6-GlcNAc sintasas implicadas en la síntesis del polisacárido extracelular de los biofil-

mes de estas bacterias (véase, apartado 3.1.4 de Resultados). Inmediatamente en posición 5' de *spr0091*, se encuentra *spr0092* (también denominado *capD* o *aatA*). El producto predicho de este gen es una proteína con cuatro potenciales dominios transmembrana que codificaría la enzima UDP-GlcNAc 4,6-deshidratasa que convierte UDP-GlcNAc en UDP-4-ceto-6-desoxi-D-glucosa, en la ruta de síntesis de UDP-2-acetamido-4-amino-2,4,6-tridesoxigalactosa, un precursor imprescindible en la biosíntesis tanto de los TAs y LTAs como del CPS de serotipo 1 de *S. pneumoniae* (Aanensen *et al.*, 2007).

```

uniprot|Q9RQP9|ICAA_STAA8      -----MQFFN-----FLLFYFVFMSTIYWIVGSI 23
uniprot|Q8XAR5|PGAC_ECO57      MINRIVSFFILCLVLCIPLCVAYFHSGELMMRFVFWPFFMSIMWVGGV 50
Spr0091                          -----MSSKVSQGFQDKNGKV 15
                                   : . . . : * :

uniprot|Q9RQP9|ICAA_STAA8      YFYFTREIRYSLNK-KPDINVDELEGITFLLACYNESETIEDTLNVLAL 72
uniprot|Q8XAR5|PGAC_ECO57      YFWVYRERRWPWGENAPAPQLKDNPSISIIIPCFFNEEKVVEETIHAALAQ 100
Spr0091                          LKIMIEWWKEKFRRVVVTQNVES-LLVSVIVISAYNEEKYLPGLIEDLKNQ 64
                                   . . . : . . . : : : : : * : : :

uniprot|Q9RQP9|ICAA_STAA8      KY--EKKEIIIINDGSSDNTAELIYKIKENN-DFIFVDLQEN--RGKANA 117
uniprot|Q8XAR5|PGAC_ECO57      RY--ENIEVIAVNDGSTDKTRAILDRMAAQIPLHRVHILAQN--QGKAIA 146
Spr0091                          TYPKEDIEILFINAMSTDGTTAIQQFIKEDTEFNISIRLYNNPKKNQASG 114
                                   * * . * : * * : * : : : : . : : * : * : : * .

uniprot|Q9RQP9|ICAA_STAA8      LNQGKQASDYVMCLDADTIVDQDAPYYMIENFKHDPKLGAVTGNPRIR 167
uniprot|Q8XAR5|PGAC_ECO57      LKTGAAAKSEYLVCIDGDALLDRDAAAYIVEPMLYNPRVGAVTGNPRIR 196
Spr0091                          FNLGVKHSVGDLLIKIDAHSKVTESFVMNNVAIIQQGEFVCGGPRPTIVE 164
                                   : : * : : : : * : : : . . : : : . : : . : .

uniprot|Q9RQP9|ICAA_STAA8      NKSSILGKIQTIEYASLIGCIKRSQTLGAVNTISGVFTLFKKSAAVVDVG 217
uniprot|Q8XAR5|PGAC_ECO57      TRSTLVGKIQVGEYSSIIIGLIKRTQRIYGNVFTVSGVIAAFRRSALAEVG 246
Spr0091                          GKQKWAETLHLVEENMFGSSIANYRNSSDRYVSSIFHGMVKREVFQKVG 214
                                   : . . : : : * : : . * . : : . * . : : : . . **

uniprot|Q9RQP9|ICAA_STAA8      YWDTDM-ITEDIAVSWKHLHRYRIKYEPLAMCWMLVPETLGGWLKQVRV 266
uniprot|Q8XAR5|PGAC_ECO57      YWSDDM-ITEDIDISWKLQNLQWTFIYEPRALCWILMPETLKGWLKQRLR 295
Spr0091                          LVNEQLGRTEEDNDIHYRIREHGKIRYSPSILSYQYIRPTFKKMLHQKYS 264
                                   . : : * * * : : : : . : * * * : : : : * : : : * :

uniprot|Q9RQP9|ICAA_STAA8      WAQGGHEVLLRDFSTMKTKRFLYILMFEQIISILWVYIVLLYLGLYFI 316
uniprot|Q8XAR5|PGAC_ECO57      WAQGGAEVFLKNMTRLWRKENFRMWPLFFEYSLTTIWAFTCLVGFIIYAV 345
Spr0091                          NG-----LWIGLTSHVQFKCLSLFHYVPCFLVLSLVSFLALLPITFVFI 308
                                   . : : : : : : : : : : : : : : : : * : : : :

uniprot|Q9RQP9|ICAA_STAA8      TANFLDYTFMTYSFSIFLLSSFTMTFINVIQFTVALFIDSRYEKKNMAGL 366
uniprot|Q8XAR5|PGAC_ECO57      QLAGVPLNIELTHIAATHTAGILLCTLCLLQFIVSLMIENRYEHNLTSSL 395
Spr0091                          TLLLGAYFLLSLLTLLTLKHKNGFLIVMPFLL-FSIFAYGLGTIVGL 357
                                   : : : : : : : : : : * : : * . * : : *

uniprot|Q9RQP9|ICAA_STAA8      IFVSWYPTVYWIINAAVVLVAFPKALKRKKGGYATWSSPDRGNTQR 412
uniprot|Q8XAR5|PGAC_ECO57      FWIIWFPVIFWMLSLATTLVSTFTRVMLMPKQARARVWSPDRGILRG 441
Spr0091                          IRG-----FKWKKEYKGTIIYLDKISQINKNML----- 385
                                   : : . * . : : : : : *
    
```

Figura 44. Alineamiento múltiple (ClustalW2) de las proteínas Ica de *S. aureus*, PgaC de *E. coli* y Spr0091 de *S. pneumoniae* R6. Se indican los aminoácidos idénticos (*) y aquellos cambios que dan lugar a residuos más (:) o menos (.) conservados entre las tres proteínas. Los guiones corresponden a huecos introducidos para optimizar el alineamiento.

Los resultados de los experimentos de mutagénesis en lo que respecta a la capacidad de formación de biofilm de los diferentes mutantes construidos se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Capacidad de formación de biofilmes por mutantes en enzimas relacionadas con azúcares

Mutante	Gen interrumpido	Formación de biofilm (%) ^b
P124	<i>strH</i>	↓ (79)
P163	<i>strH lytA</i>	↓ (40)
P186	<i>spr0091</i>	–
P187	<i>spr0092 (capD)</i> ^a	–
P173	<i>spr0135</i>	–
P180	<i>spr0136</i>	–
P133	<i>endoD</i>	↓ (82)
P144	<i>bgaA</i>	↓ (80)
P164	<i>bgaA lytA</i>	↓ (60)
P174	<i>spr1223</i>	↓ (75)
P175	<i>spr1224</i>	↓ (75)
P176	<i>spr1459</i>	↓ (75)
P178	<i>spr1655</i> ^a	–
P190	<i>spr1223 spr1459</i>	↓ (70)

^a Genes no incluidos en la base de datos CAZy pero anotados como posiblemente implicados en la biosíntesis de polisacáridos en el genoma de R6.

^b –, sin efecto; ↓, disminución en la formación de biofilm. Entre paréntesis, se indica el porcentaje de formación de biofilm con respecto a la cepa parental no mutada.

Los mutantes de inserción en los genes *spr0091* y *spr0092* no tuvieron ninguna diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre en cuanto a la formación de biofilm (Tabla 16). Se construyeron también unos mutantes que sobreexpresaban estos genes (P196 y P197), utilizando el plásmido pLSE4. Estos mutantes tampoco mostraron diferencias significativas en la formación de biofilm (datos no mostrados).

El doble mutante *strH lytA* (P163) fue el que menor biofilm formó de todos los mutantes de inserción (40% respecto a la cepa parental). Los mutantes en la glicosiltransferasas P174, P175, P176 y P190 mostraron una disminución en la capacidad de formar biofilm similar entre ellos y también a algunos mutantes en las glicosidasas EndoD, StrH y BgaA (cepas P133, P124 y P144, respectivamente).

3.2.2. Degradación del EPS

Con la idea inicial de identificar posibles enzimas neumocócicas capaces de degradar el componente polisacárido de la matriz extracelular del biofilm, realizamos ensayos de disgregación del biofilm utilizando tres enzimas de *S. pneumoniae* producidas comercialmente: la neuraminidasa A (NanA; Spr1536), O-glicosidasa (Eng; Spr0328) y la endo- β -N-acetilglucosaminidasa D (EndoD; Spr0440) (Tabla 15). Estas enzimas tienen en común su participación en la patogénesis de neumococo modificando receptores glicosídicos de las células de hospedador, facilitando así la adherencia y la colonización neumocócica. Además, como se mostrará más adelante, se utilizó también una pululanasa (de *Bacillus acidopullulyticus*) y LytB, una CBP (N-acetilglucosaminidasa; Tabla 15) responsable de la separación de las células hijas al final de la división celular (véase, apartado 1.5 de la Introducción).

NanA cataliza la liberación de residuos de ácido siálico terminales de glicoconjugados y está implicada en la colonización del hospedador en modelos animales de infección (Tong *et al.*, 2000). De gran interés es la capacidad de NanA para modificar residuos de la superficie celular de otras bacterias competidoras en la nasofaringe como *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae* (Shakhnovich *et al.*, 2002). Además, recientemente se ha demostrado que NanA está implicada en la formación del biofilm neumocócico (Parker *et al.*, 2009). Eng es una O-glicosidasa (endo- α -N-acetilgalactosaminidasa) que corta residuos de galactosa 1-3-GalNAc de O-glicanos (oligosacáridos unidos por enlace O-glicosídico a Ser o Thr de una cadena polipeptídica). Además, se ha demostrado que esta O-glicosidasa se requiere, junto con la neuraminidasa NanA, para que neumococo corte O-glicanos sialilados (Marion *et al.*, 2009). EndoD hidroliza la estructura di-N-acetilquitobiosa de los oligosacáridos unidos por enlace N-glicosídico a residuos de Asn (N-glicanos). Generalmente, este enzima que presenta un motivo LPXTG típico de proteínas de superficie de bacterias Gram-positivas, actúa sobre los oligosacáridos complejos después de que NanA y Eng eliminen los azúcares terminales (Muramatsu *et al.*, 2001).

En nuestras condiciones experimentales, ninguna de las enzimas utilizadas disgregó el biofilm neumocócico (datos no mostrados). Ello podría ser debido, tal vez, a las cantidades limitadas de enzima que pudieron ser utilizadas.

Como ya se ha indicado previamente, neumococo posee una pululanasa (SpuA) (EC 3.2.1.41) (Tabla 15) que es capaz de degradar el glucógeno de las células epiteliales del pulmón (Lammerts van Bueren *et al.*, 2007; 2011; Abbott *et al.*, 2010).

RESULTADOS

Para estudiar el efecto que esta actividad enzimática podría tener sobre la matriz extracelular del biofilm neumocócico, se utilizó una pululanasa comercial y, como se puede observar en la figura 45, la pululanasa posee capacidad para disgregar y eliminar eficazmente el biofilm neumocócico.

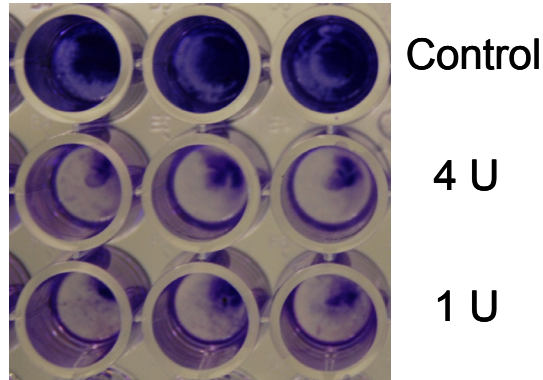


Figura 45. Ensayo de disgregación del biofilm de *S. pneumoniae* R6 con pululanasa de *B. acidopullulyticus* (1 y 4 U) y control sin enzima. Biofilm de 6 h a 34°C y disgregación de 1 h a 37°C.

Los mutantes *lytB* de *S. pneumoniae*, además de formar largas cadenas en un cultivo planctónico, presentan una menor capacidad para formar un biofilmes que la cepa parental (Moscoso *et al.*, 2006). Debido a ello, decidimos analizar en mayor detalle el papel que podría desempeñar esta CBP en las etapas iniciales de formación de los biofilmes de neumococo. En primer lugar, se realizaron ensayos de inhibición de la formación de biofilm con distintas cantidades de *lytB* (Fig. 46). La formación de biofilm fue claramente inhibida con 5 y 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de *LytB* pero el efecto de la enzima no parece ser bactericida ya que no se observó una mayor proporción de células muertas en el biofilm tratado que en el control (Fig. 47). También se realizaron ensayos de disgregación del biofilm neumocócico con 5, 10 y 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de *LytB* y se comprobó que *LytB* no afecta al mantenimiento del biofilm ya formado (datos no mostrados). Por tanto, la proteína *LytB* parece ser importante en las etapas de formación del biofilm neumocócico pero no en el mantenimiento del mismo una vez formado.

RESULTADOS

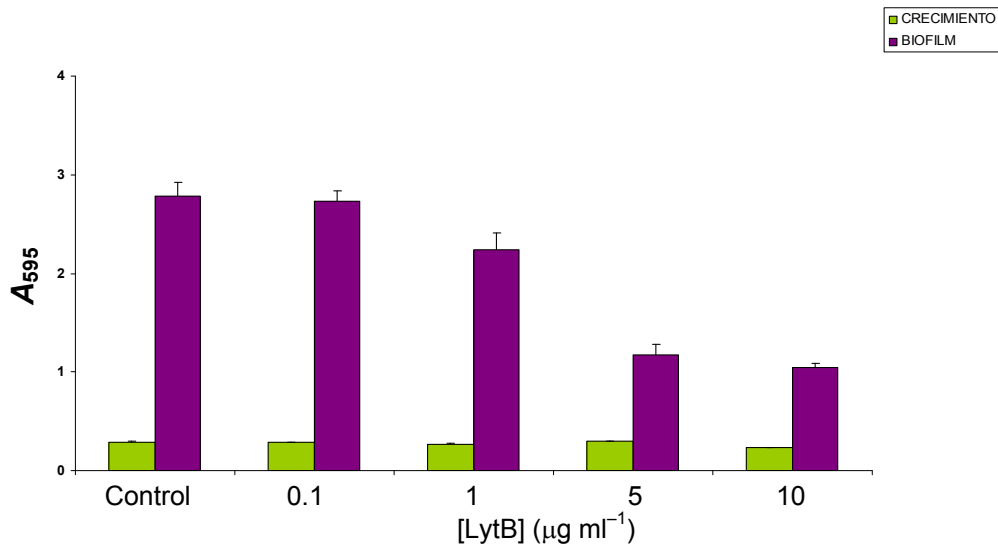


Figura 46. Ensayo de inhibición de formación de biofilm en *S. pneumoniae* R6 con distintas concentraciones de LytB y el control sin tratamiento. Biofilm de 6 h a 34°C. *** $P < 0.001$

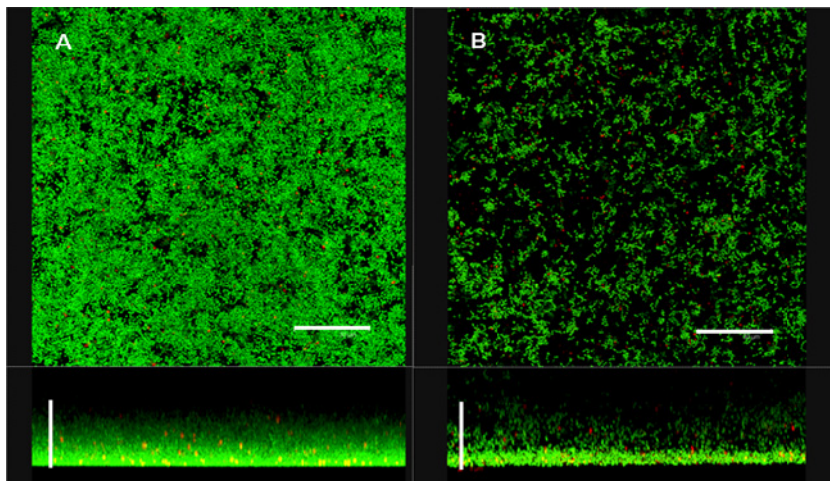


Figura 47. Ensayo de inhibición del biofilm de *S. pneumoniae* R6 con 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de LytB (Panel B) y el control sin tratamiento (Panel A). Biofilm de 6 h a 34°C. Reconstrucción tridimensional horizontal (plano xy) y vertical (plano xz). Visualizamos las células bacterianas teñidas con el kit de viabilidad: fluorescencia en verde, bacterias viables y fluorescencia en rojo, bacterias no viables. Barra, 30 μm .

En una serie de experimentos posteriores, se realizaron ensayos de formación de biofilm con un mutante *lytB* de *S. pneumoniae* (cepa R6B) que forma menos biofilm que la cepa silvestre *S. pneumoniae* R6 (Moscoso *et al.*, 2006). Como se observa en la figura 48, *S. pneumoniae* R6B incrementa su formación de biofilm con aportes de 0.01 hasta 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de LytB. A bajas concentraciones de la enzima, el mutante *lytB* puede llegar a formar un biofilm similar al de la cepa silvestre (Fig. 48) pero, si la concentración de CBP supera 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$, se inhibe la formación de biofilm. Esto demuestra aún más la importancia de LytB en la formación del biofilm de neumococo.

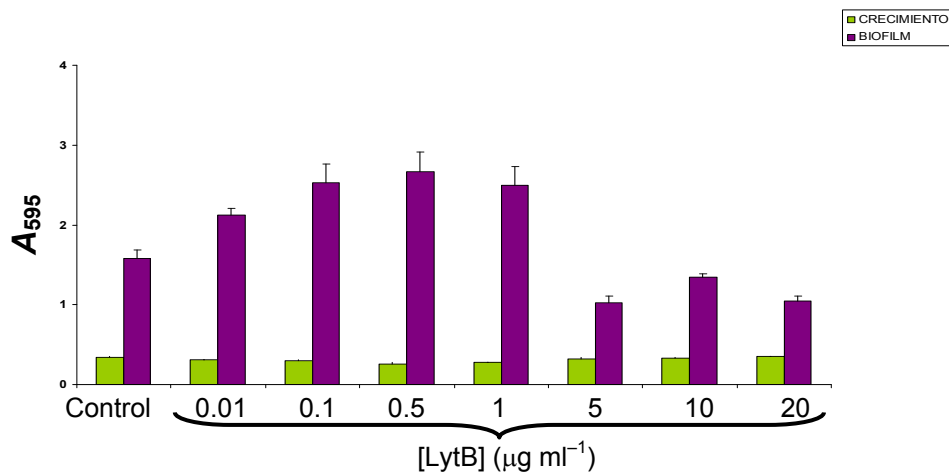


Figura 47. Ensayo de inhibición del biofilm de *S. pneumoniae* R6B con distintas cantidades de LytB y el control sin tratamiento. Biofilm de 6 h a 34°C.

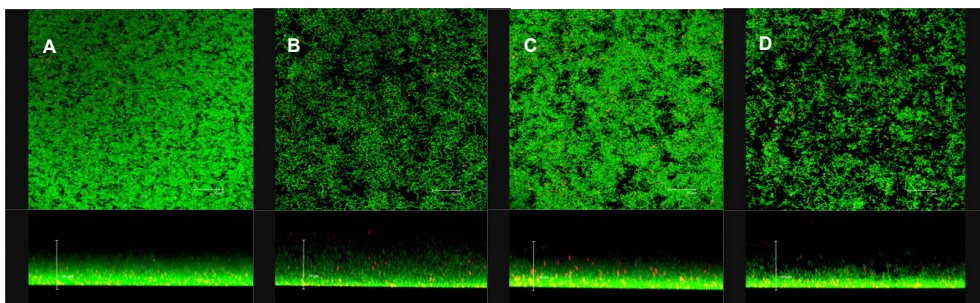


Figura 48. Ensayo de formación de biofilm en *S. pneumoniae* R6B (*lytB*) con 0.5 y 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de LytB (paneles C y D, respectivamente) y el control sin tratamiento (panel B). Como control, se muestra un biofilm de *S. pneumoniae* R6 (panel A). Biofilm de 6 h a 34°C. Reconstrucción tridimensional horizontal (plano xy) y vertical (plano xz). Las bacterias viables muestran fluorescencia verde y, las no viables, roja. Barra 30 μm .

3.3. Extracción del exopolisacárido y análisis de carbohidratos

Las proteínas extracelulares son importantes tanto para la formación como para el mantenimiento del biofilm de *S. pneumoniae* (Moscoso *et al.*, 2006). Puede que el exopolisacárido del biofilm de neumococo no sea exclusivamente un polisacárido sino que esté unido a proteínas. Como primera aproximación para determinar el tipo de asociación del polisacárido extracelular a la estructura del biofilm se analizó el contenido proteico de las distintas fracciones obtenidas tras la extracción y purificación del exopolisacárido, como se muestra esquemáticamente en la figura 49. El contenido proteico fue mayor en la muestra de biofilm que en un cultivo planctónico (Tabla 17).

Tabla 17. Contenido proteico de la fracción del exopolisacárido de la matriz del biofilm.

Muestra	Conce ntración ^a (mg ml ⁻¹)
B1	2.8
BP1	2.2
P1	0.6
B2	1.2
BP2	ND ^b
P2	ND ^b

^a Se extrae el exopolisacárido de 1 litro de biofilm o de cultivo planctónico y se concentra la muestra mil veces para cuantificar por el método de Bradford (1976).

^b ND, no detectable. La sensibilidad del método es de 5 µg ml⁻¹ de proteína.

El análisis de la composición de monosacáridos puso de manifiesto la presencia de residuos de glucosa en las fracciones insolubles del biofilm, del planctónico de ese biofilm y del cultivo planctónico (datos no mostrados). La cantidad de glucosa detectada fue cuatro veces más abundante en el biofilm que en el cultivo planctónico y el doble que en el planctónico del biofilm.

En cuanto a la estructura de los carbohidratos del exopolisacárido del biofilm de *S. pneumoniae* se obtuvo que tanto en la parte insoluble del biofilm (B1) como del planctónico de ese biofilm (BP1) hay un pico de glucosa (1→4). En el cultivo

planctónico también aparece glucosa (1→4) pero en mucha menor abundancia (Fig. 50). En la fracción B1 se observó un pico adicional, identificado como glucosamina (1→4) y posiblemente correspondiente a GlcNAc previa desacetilación. No se encontró ningún carbohidrato en las fracciones solubles del biofilm (B2), ni en el planctónico de ese biofilm (BP2), ni en el cultivo planctónico (P2) (datos no mostrados).

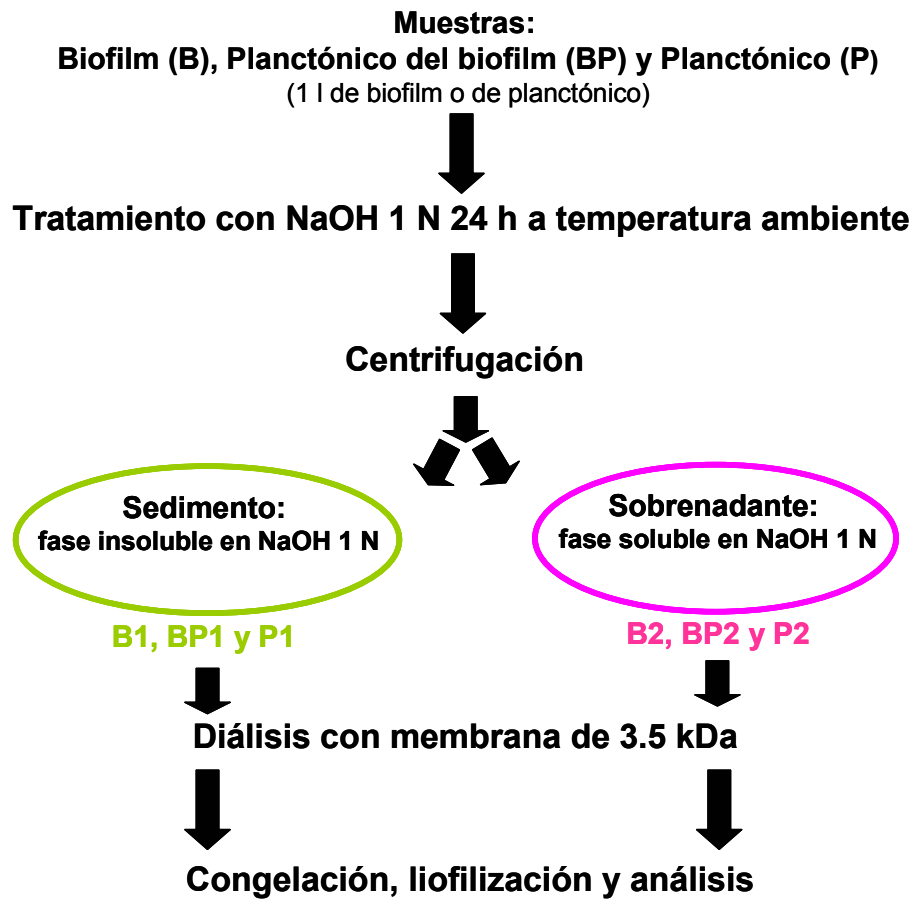
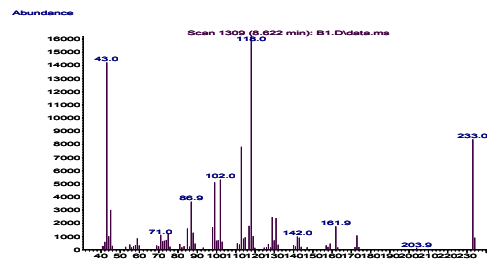


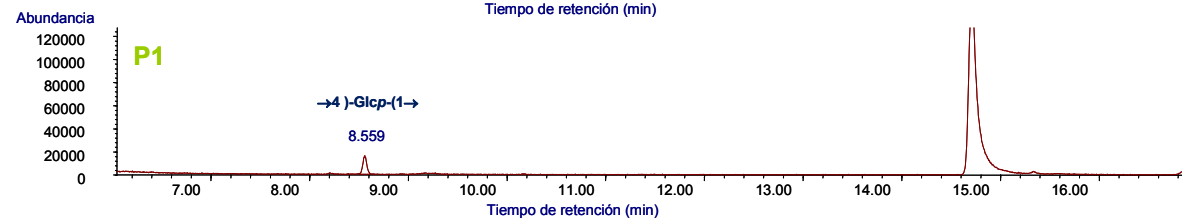
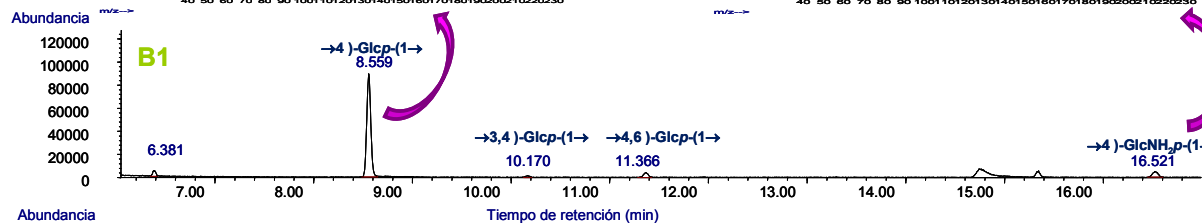
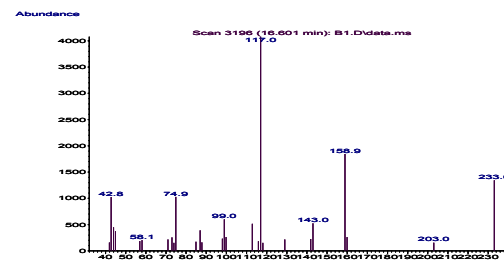
Figura 49. Esquema de la extracción y purificación del exopolisacárido de la matriz del biofilm neumocócico de R6.

144

Espectro de masas de (1→4)-glucosa



Espectro de masas de (1→4)-glucosamina



RESULTADOS

Figura 50. Cromatogramas de las muestras insolubles en sosa del biofilm (B1), del planctónico del biofilm (BP1) y del cultivo planctónico (P1) y los espectros de masas de las dos estructuras encontradas en las muestras. Los picos no señalados corresponden a restos de la reacción de metilación o subproductos.

En el cromatograma de la fracción insoluble del biofilm (B1) también se observan otros dos picos (tiempo de retención 10.170 min y 11.366 min) (Fig. 50), identificados como glucosa. Éstos son, muy probablemente, ramificaciones de la cadena principal de glucosa (1→4), ya que se observa otro pico con un tiempo de retención (6.381 min) que podría deberse a residuos terminales.

La glucosa (1→4) y glucosamina (1→4) aparecen en las fracciones insolubles en NaOH; esta notable insolubilidad del polisacárido extracelular en álcali sugiere la presencia de un β -glucano (Kanetsuna y Carbonell, 1970).

Todos estos resultados vuelven a confirmar los datos obtenidos anteriormente con el calcoflúor, las lectinas SBA y WGA y los enzimas hidrolíticas.

4. BIOFILMES DE *S. PNEUMONIAE* Y SISTEMA INMUNE DEL HOSPEDADOR

La colonización del tracto respiratorio superior por *S. pneumoniae* así como el desarrollo posterior de la enfermedad (neumonía, sepsis y meningitis, entre otras manifestaciones) tienen lugar mediante el establecimiento de interacciones complejas entre la bacteria y el hospedador. Una de las características clave del crecimiento microbiano en forma de biofilmes es la tolerancia de estas comunidades a la terapia antibiótica y al ataque del sistema inmune del hospedador. La persistencia de bacterias en las infecciones crónicas se ha asociado a su capacidad de formar biofilmes, como ya se ha comentado en la Introducción; se cree que el establecimiento de éstos en los tejidos del hospedador conduce a la expresión de determinados factores relacionados con la eficacia biológica y de protección contra las defensas del hospedador. Por estas razones, el estudio del papel de los biofilmes en las interacciones hospedador-patógeno tiene relevancia clínica.

En el presente capítulo se estudió si *S. pneumoniae* desarrolla una capacidad incrementada para evadir el sistema inmune cuando se multiplica en forma de biofilm. Para ello, se analizó primeramente el depósito de C3b, que es un componente central del sistema del complemento debido a que las tres vías de activación convergen en este factor. Posteriormente, se analizó el depósito de otros componentes, como el C1q y la proteína de fase aguda CRP, con el fin de estudiar la activación de la vía clásica así como la interacción con los reguladores negativos del complemento C4BP y fH. Por último se estudió la posible repercusión fisiológica de todo ello en la opsonofagocitosis, utilizando tanto biofilmes como cultivos planctónicos de neumococo.

4.1. Evasión del sistema de complemento por parte de los biofilmes neumocócicos

Para el análisis del depósito de las distintas moléculas del complemento se utilizó la citometría de flujo. En una primera fase, se comprobó que no existían diferencias significativas en la deposición de moléculas del complemento sobre la superficie bacteriana ya fuera utilizando biofilmes intactos o si éstos habían sido disgregados previamente (datos no mostrados). Después de la disgregación, la morfología de la

suspensión bacteriana es indistinguible de la de un cultivo planctónico, al microscopio de contraste de fase (Fig. 51).

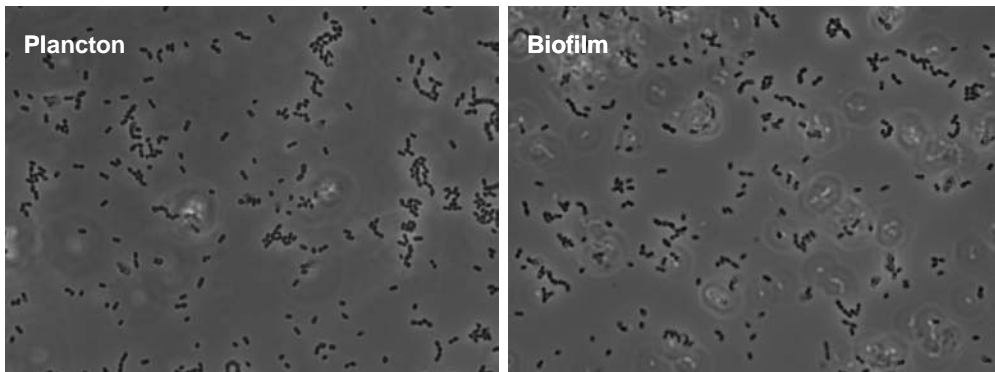


Figura 51. Microfotografía en contraste de fase de un cultivo planctónico y un biofilm disgregado de *S. pneumoniae* R6 antes de incubarlos con suero humano.

4.1.1. Depósito de C3b

Como se observa en la figura 52, entre un cultivo planctónico y un biofilm de neumococo, existen diferencias significativas en el depósito de C3b, siendo un 60% menor en un biofilm que en un cultivo planctónico; esto indica que el biofilm evade el complemento de forma más eficiente que un cultivo planctónico. Estos resultados fueron corroborados mediante CLSM y microscopía de fluorescencia (Figs. 53 y 54), donde se observa una mayor unión de C3b-FITC (Tabla 7) al cultivo planctónico y cómo los anticuerpos recubren toda la superficie bacteriana en el cultivo planctónico mientras que no se localiza en todo el espesor del biofilm. Para determinar la especificidad de la unión de C3b-FITC, se llevaron a cabo ensayos control utilizando tanto suero inactivado como muestras no incubadas con suero y, en ningún caso, se observó unión de C3b-FITC a neumococo (datos no mostrados).

El índice de fluorescencia refleja la proporción de bacterias fluorescentes multiplicada por la intensidad de la fluorescencia expresada como la media geométrica de la misma. Es un método que se ha utilizado ampliamente porque permite analizar, no sólo el porcentaje de bacterias fluorescentes, sino también cuantificar la in-

tensidad de la interacción con la molécula que se esté evaluando (Exley *et al.*, 2005; Yuste *et al.*, 2008).

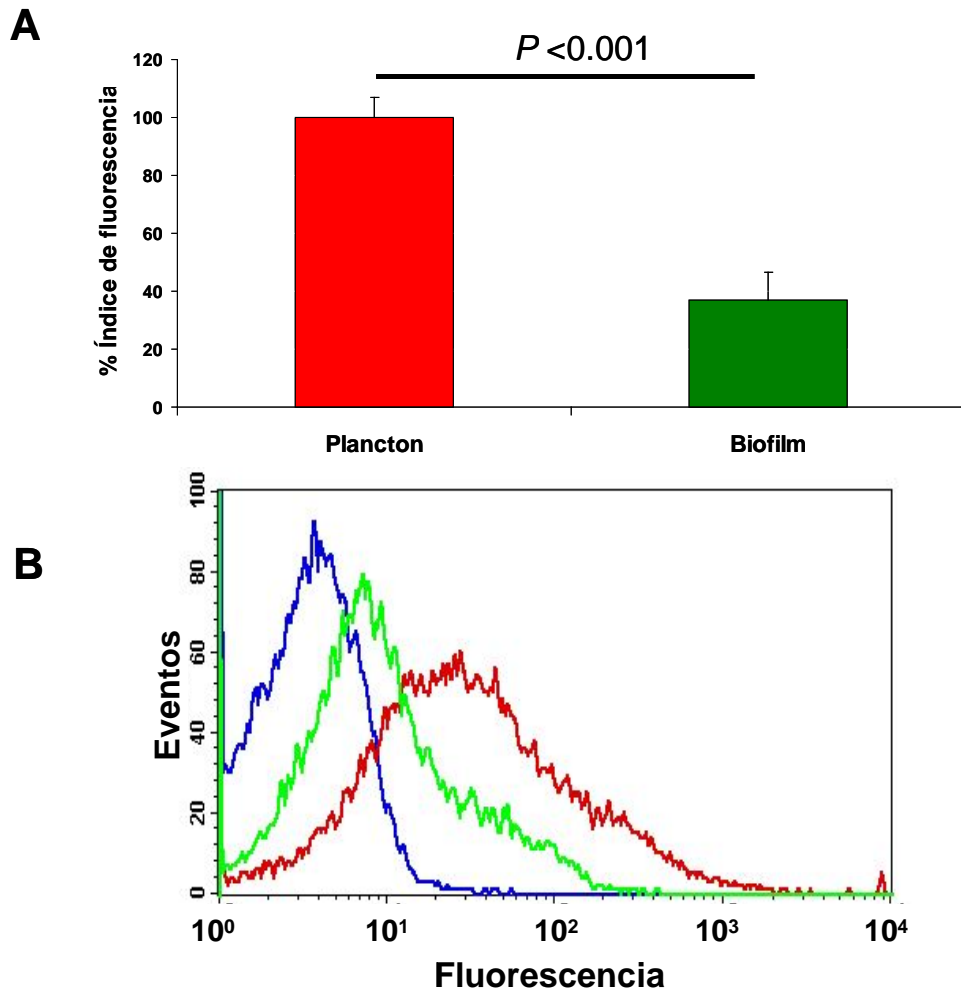


Figura 52. Depósito de C3b en *S. pneumoniae* R6. **A.** Porcentaje relativo del índice de fluorescencia. **B.** Histograma de citometría de flujo sobre cultivo planctónico o biofilm. La curva control muestra los resultados en ausencia de suero.

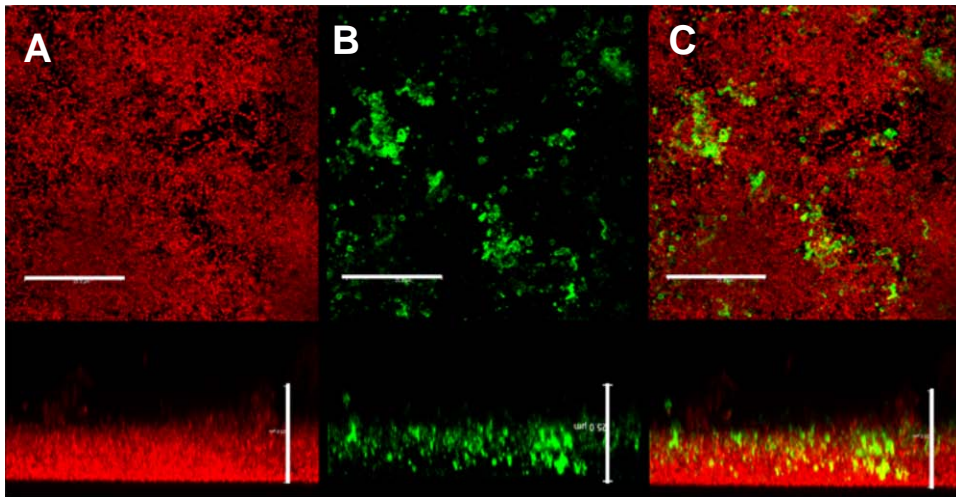


Figura 53. Depósito de C3b sobre un biofilm neumocócico. Imágenes de CLSM donde visualizamos en rojo a *S. pneumoniae* R6 (SYTO 59) y, en verde, el depósito de C3b (C3b-FITC) sobre el biofilm. La imagen C corresponde a la superposición de los canales A (bacteria) y B (molécula de C3b). Barra, 25 μ m.

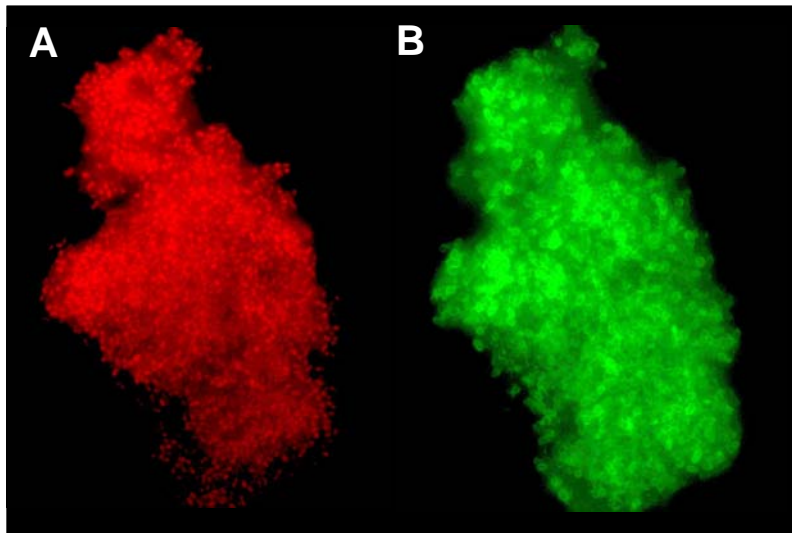


Figura 54. Depósito de C3b sobre un cultivo planctónico de *S. pneumoniae* R6. Imágenes de microscopía de fluorescencia donde visualizamos la bacteria en rojo (SYTO 59) y, en verde, el depósito de C3b.

4.1.2. Evasión de la vía clásica

Una vez demostrado que el crecimiento de neumococo en forma de biofilm le permite evadir eficazmente el complemento, nos propusimos profundizar en el mecanismo de dicha evasión. Como ya se ha dicho en la Introducción (Apartados 1.2.1 y 1.2.4), CRP se une a la fosforilcolina de la superficie de las células apoptóticas y de varias bacterias, incluyendo a neumococo. Mediante su unión a la superficie celular bacteriana, CRP es capaz de activar la vía clásica del complemento a través de C1q, lo que conduce a una fagocitosis posterior mucho más eficaz. Dado que la vía clásica es la más importante en neumococo, se procedió a analizar el depósito de C1q (Fig. 55) y CRP (Fig. 56).

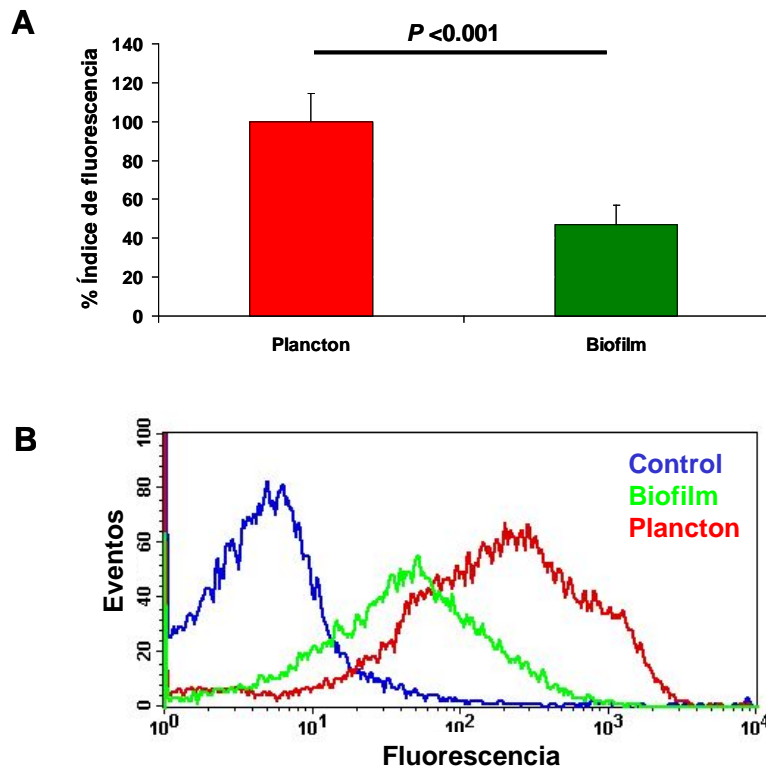


Figura 55. Depósito de C1q. **A.** Porcentaje relativo del índice de fluorescencia. **B.** Histograma de citometría de flujo utilizando un cultivo planctónico o un biofilm de *S. pneumoniae* R6. La curva control muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero.

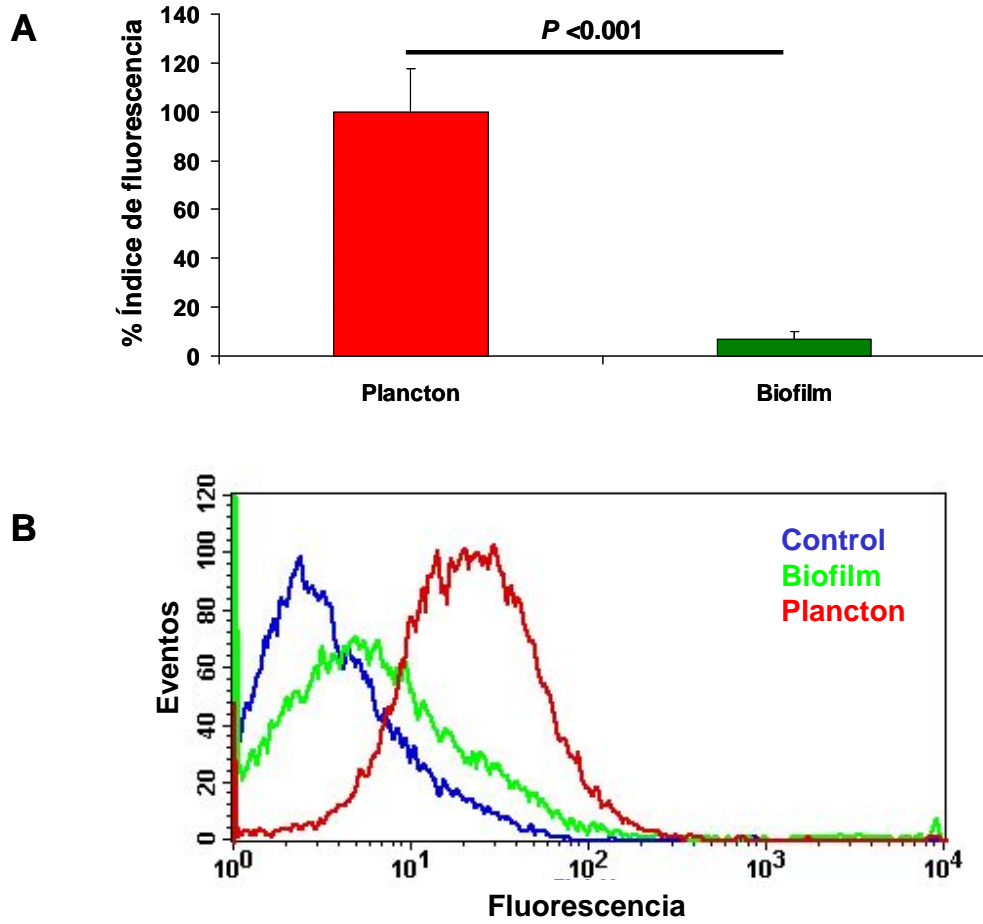


Figura 56. Depósito de CRP. **A.** Porcentaje relativo del índice de fluorescencia. **B.** Histograma de citometría de flujo sobre cultivo planctónico o biofilm de *S. pneumoniae* R6. La curva control muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero.

Los resultados obtenidos muestran que, cuando *S. pneumoniae* R6 se multiplica en forma de biofilm, la activación de la vía clásica se ve dificultada de manera significativa reduciendo el reconocimiento de neumococo por CRP y el primer componente de la vía clásica, C1q. De este modo, la multiplicación de neumococo en forma de biofilm, evade más eficazmente el sistema inmune del hospedador que cuando lo hace en forma planctónica, y explicaría los mayores niveles de C3b encontrados en el cultivo planctónico.

4.1.3. Reclutamiento de reguladores

Una vez comprobado que, cuando neumococo crece en forma de biofilm, se produce un bloqueo de la vía clásica del sistema del complemento (ya que existe un menor depósito de C1q, CRP y C3b en la superficie de las bacterias que lo integran), se estudió si el biofilm neumocócico en comparación con un cultivo planctónico, es capaz de reclutar, de forma más eficaz, alguno o algunos de los reguladores negativos del sistema del complemento (fH y C4BP). En primer lugar, se observó que las

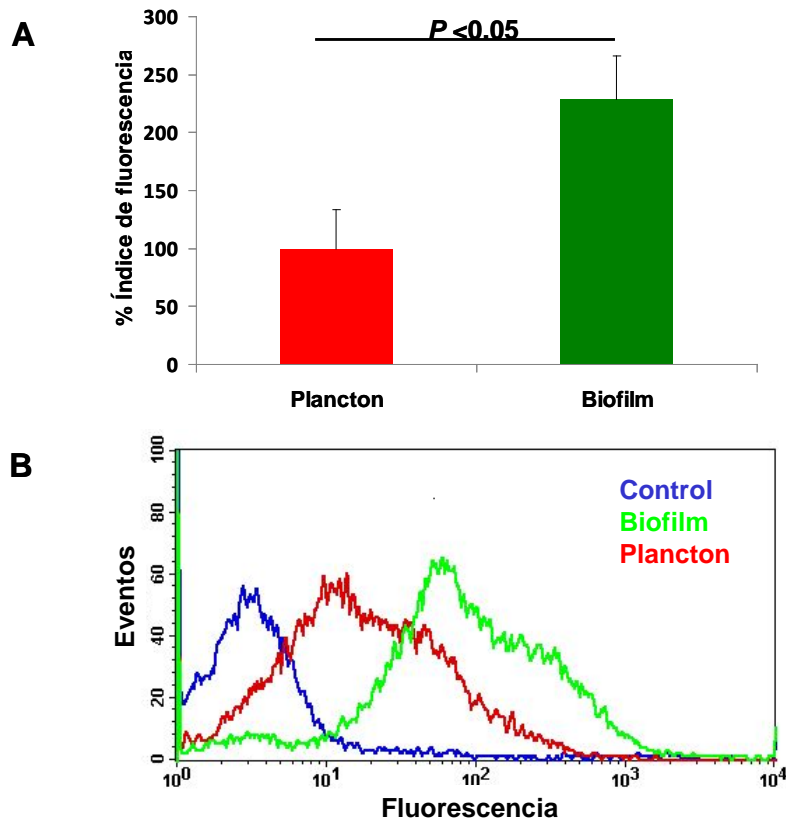


Figura 57. Depósito de Factor H. **A.** Porcentaje relativo del índice de fluorescencia. **B.** Histograma de citometría de flujo sobre cultivo planctónico y sobre biofilm de *S. pneumoniae* R6. La curva control muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero.

células del biofilm unen más fH que las de un cultivo planctónico (Fig. 57). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el depósito de C4BP sobre las células planctónicas y del biofilm (datos no mostrados). Estos resultados juntos con los obtenidos de los estudios de evasión del complemento, confirman que *S. pneumoniae* multiplicándose en forma de biofilm además de bloquear la vía clásica (Figs. 52, 55 y 56), también bloquea la vía alternativa (Fig. 57).

Con el fin de analizar el papel de la proteína PspC en el reclutamiento de fH cuando *S. pneumoniae* se multiplica en forma de biofilm o cultivo planctónico, se estudió el depósito de fH utilizando un mutante isogénico *pspC* de la cepa R6.

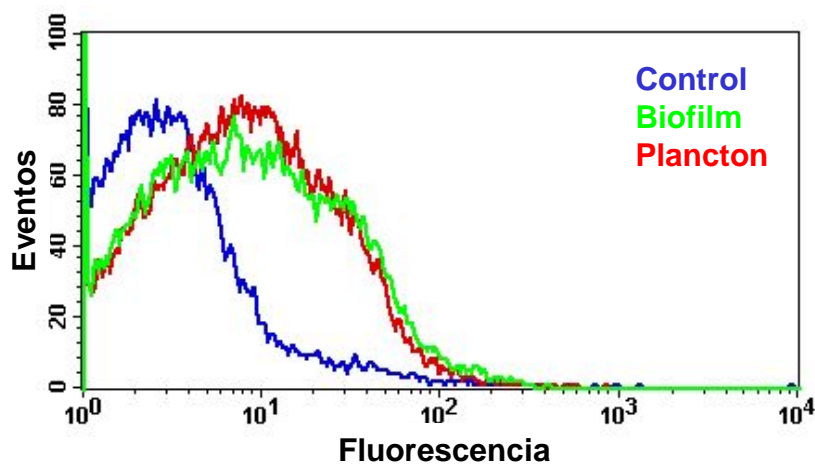


Figura 58. Depósito de Factor H sobre la cepa P064 (*pspC*) de *S. pneumoniae*. Histograma de citometría de flujo sobre cultivo planctónico y sobre biofilm de *S. pneumoniae*. La curva control muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero.

Los resultados mostrados en la figura 58 indican que el reclutamiento de fH es dependiente de la proteína PspC ya que, en el depósito de fH sobre un mutante *pspC* (cepa P064), no se observan diferencias significativas entre un cultivo planctónico y un biofilm, a diferencia de lo que sucede en la cepa parental *pspC*⁺ (Fig. 57).

4.2. Oponofagocitosis

Para evaluar la susceptibilidad de los biofilmes de neumococo a la oponofagocitosis, se determinó la proporción de células de neumococo fagocitadas por neutrófilos polimorfonucleares humanos. Para ello, se utilizó la cepa P040 de neumococo (que expresa la GFP) opsonizada con suero humano y la línea celular humana HL-60 diferenciada a granulocitos (Martinez *et al.*, 1999). Experimentos preliminares demostraron que no existían diferencias significativas en la fagocitosis de las células de un biofilm disgregado y las de un biofilm intacto (datos no mostrados).

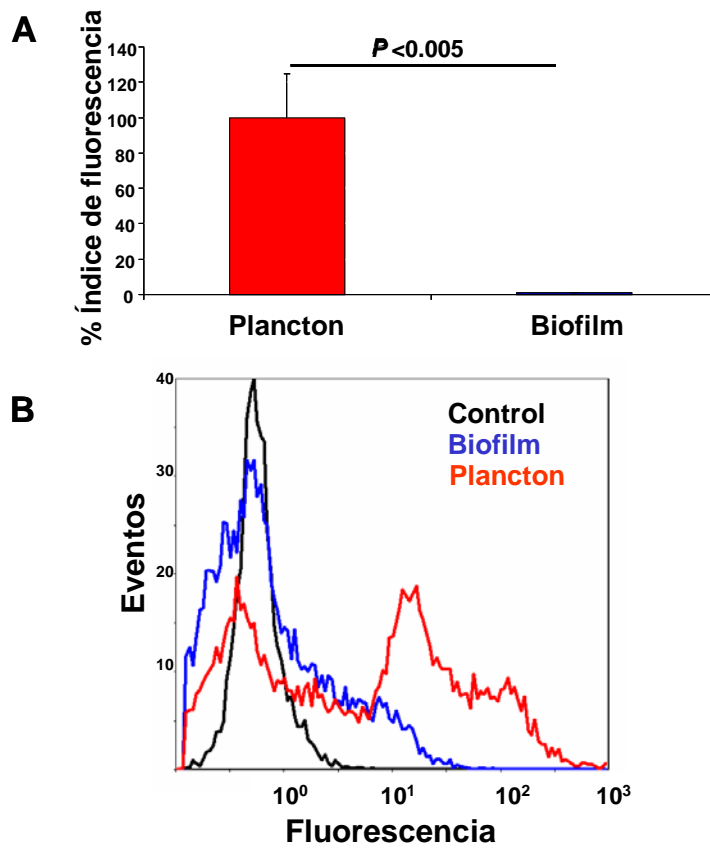


Figura 59. Oponofagocitosis de un biofilm neumocócico. **A.** Porcentaje relativo del índice de fluorescencia. **B.** Histograma de citometría de flujo de un cultivo planctónico y un biofilm de *S. pneumoniae* P040. La curva control muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero. En este ensayo, la proporción de células HL60 y bacterias fue de 1:40.

Sobre la base de los resultados obtenidos (Fig. 59), se puede afirmar que la fagocitosis de las células planctónicas fue más eficiente que las de un biofilm, lo que sugiere que el crecimiento sésil de las bacterias contribuye a la evasión de la fagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares humanos.

5. TERAPIA CONTRA LOS BIOFILMES DE *S. pneumoniae* Y OTRAS BACTERIAS

Los biofilmes confieren protección y persistencia a las bacterias que los forman (Costerton *et al.*, 1999) y ello, sumado al aumento de las resistencias frente a los antibióticos, ha creado la necesidad de investigar y, eventualmente, desarrollar nuevas estrategias para la prevención y eliminación de estos biofilmes. Con estas premisas, nos planteamos utilizar distintas hidrolasas de pared de *S. pneumoniae* (LytA, LytB y LytC), enzimas líticas de bacteriófagos de neumococo (Cpl-1, Cpl-7, Ejl y Pal) (Fig. 3) y otros compuestos como el xilitol y la *N*-acetil-L-cisteína (NAC), para inhibir o disgregar los biofilmes de neumococo.

5.1. Estudio de la adición de xilitol al biofilm de *S. pneumoniae*

El xilitol es un pentitol obtenido por reducción de la xilosa. Este compuesto, que las bacterias orales no son capaces de fermentar y que, por tanto, no es cariogénico, inhibe la multiplicación y el metabolismo así como la producción de polisacárido por *Streptococcus mutans*, el principal productor de caries (Matsui y Cvitkovitch, 2010). Además de inhibir la multiplicación, la reducción en la producción de polisacáridos extracelulares insolubles parece ser importante tanto para reducir la carga bacteriana como para controlar su transmisión de unos individuos a otros (Söderling, 2009). Además, el xilitol puede poseer utilidad terapéutica en la profilaxis de las otitis medias agudas en niños aunque, al parecer, no es capaz de disminuir la carga bacteriana de neumococos en la nasofaringe (Danhauer *et al.*, 2010).

A la vista de los precedentes mencionados en el párrafo anterior, parecía interesante ensayar si el xilitol era capaz de interferir con la formación del biofilm por parte de la cepa R6 de *S. pneumoniae*. Los datos mostrados en la figura 60A indicaron que, en efecto, se producía una reducción estadísticamente significativa en la formación de biofilm a concentraciones ≥ 50 mg ml⁻¹. Sin embargo, la adición de xilitol a un biofilm ya formado no produjo efecto apreciable alguno a concentraciones inferiores a 150 mg ml⁻¹ (Fig. 60B).

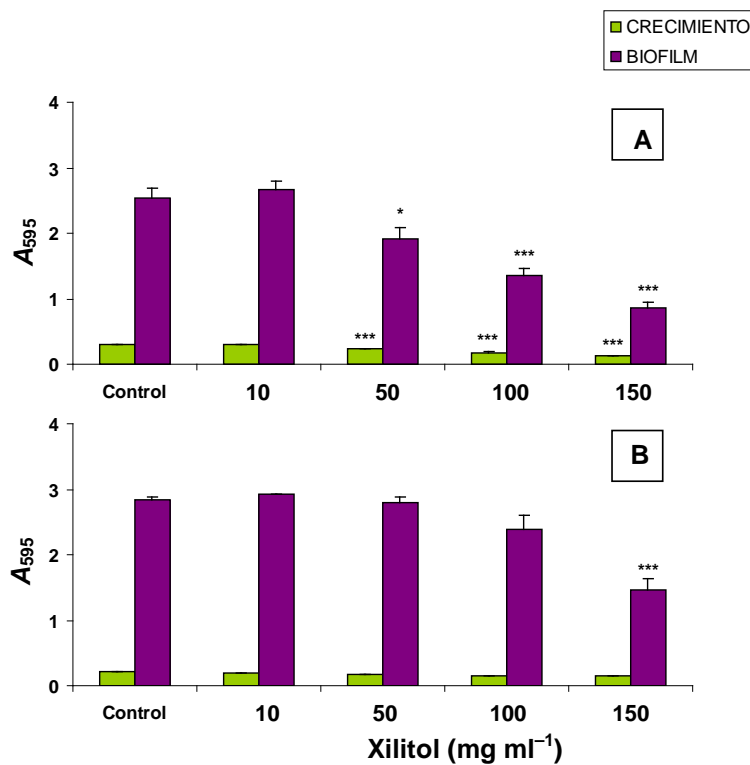


Figura 60. Efecto del xilitol en los biofilmes de la cepa R6 de neumococo. A. Ensayo de inhibición del biofilm. El compuesto se añadió al cultivo inicial y se incubó durante 6 h a 34°C para permitir la formación del biofilm. B. El xilitol se añadió después de las 6 h de incubación a 34°C sobre el biofilm ya formado tras retirar el cultivo planctónico y se dejó actuar durante 2 h más a 37°C . *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

5.2. Efecto de la N-acetil-L-cisteína en los biofilmes

De manera análoga a lo ya comentado para el xilitol, la NAC posee algunas propiedades que justifican el interés de su estudio usando biofilmes de neumococo. NAC, un antioxidante que rompe los puentes disulfuro presentes en el esputo, se emplea en el tratamiento de la bronquitis crónica, algunos tipos de cáncer y, además de ser de utilidad en los casos de envenenamiento por paracetamol, posee propiedades antibacterianas (Parry y Neu, 1977). Asimismo, se ha evidenciado que NAC posee actividad contra biofilmes de estafilococos (Venkatesh *et al.*, 2009) llegando incluso

a disgregar biofilmes maduros (Olofsson *et al.*, 2003). Por otra parte, Riise y colaboradores observaron que NAC reduce la adherencia de *S. pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* a células epiteliales de orofaringe *in vitro* (Riise *et al.*, 2000).

En las condiciones experimentales utilizadas en esta Memoria, NAC inhibió la formación de biofilm por la cepa R6 además de producir la destrucción de un biofilm ya formado, a concentraciones próximas a la MIC (4 mg ml^{-1}) (del Prado *et al.*, 2010) (Fig. 61). De particular interés resulta el hecho de que, aunque la desintegración de los biofilmes por NAC (2.5 mg ml^{-1}) no fue nunca superior al 60%, una gran proporción de las bacterias poseían una membrana dañada y, previsiblemente, no eran viables (Fig. 61C). Es importante resaltar asimismo que las concentraciones de NAC que produjeron inhibición de la formación de biofilm (o destrucción del mismo) en estos ensayos están próximas a las que teóricamente pueden alcanzarse en las secreciones orofaríngeas cuando se utilizan las dosis habituales del fármaco en humanos (Riise *et al.*, 2000).

5.3. Uso de enzimas líticas de neumococo y sus fagos contra los biofilmes de *S. pneumoniae* y otros SGM

La terapia con enzimas líticas de la pared celular podría ser una posible y prometedora alternativa a los antibióticos actuales o, al menos, un valioso complemento para un tratamiento más eficaz (Hermoso *et al.*, 2007). La necesidad de su estudio ha surgido tanto por el continuo aumento de resistencias a los antibióticos (Maestro y Sanz, 2007) como por la mayor resistencia de los biofilmes a los mismos (Lewis, 2008; Moscoso *et al.*, 2009; Pratten y Ready, 2010; Domenech *et al.*, 2011). Las enzimas líticas de pared, tanto la autolisina mayoritaria de neumococo (LytA) como las codificadas por dos de sus fagos (Pal y Cpl-1), han demostrado poseer una notable actividad bactericida sobre cultivos planctónicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Loeffler *et al.*, 2001; Jado *et al.*, 2003; Djurkovic *et al.*, 2005; Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007a, b; Witzentrath *et al.*, 2009). Aunque su uso estuvo originalmente restringido a las enzimas de origen fágico, estas enzimas (fágicas o no) que destruyen la pared bacteriana y que, en consecuencia, poseen acción antibiótica han recibido la denominación de “enzibióticos” (Nelson *et al.*, 2001). Hasta el momento, el potencial antibacteriano de los enzibióticos en la lucha contra los biofilmes de neumococo no había sido investigado.

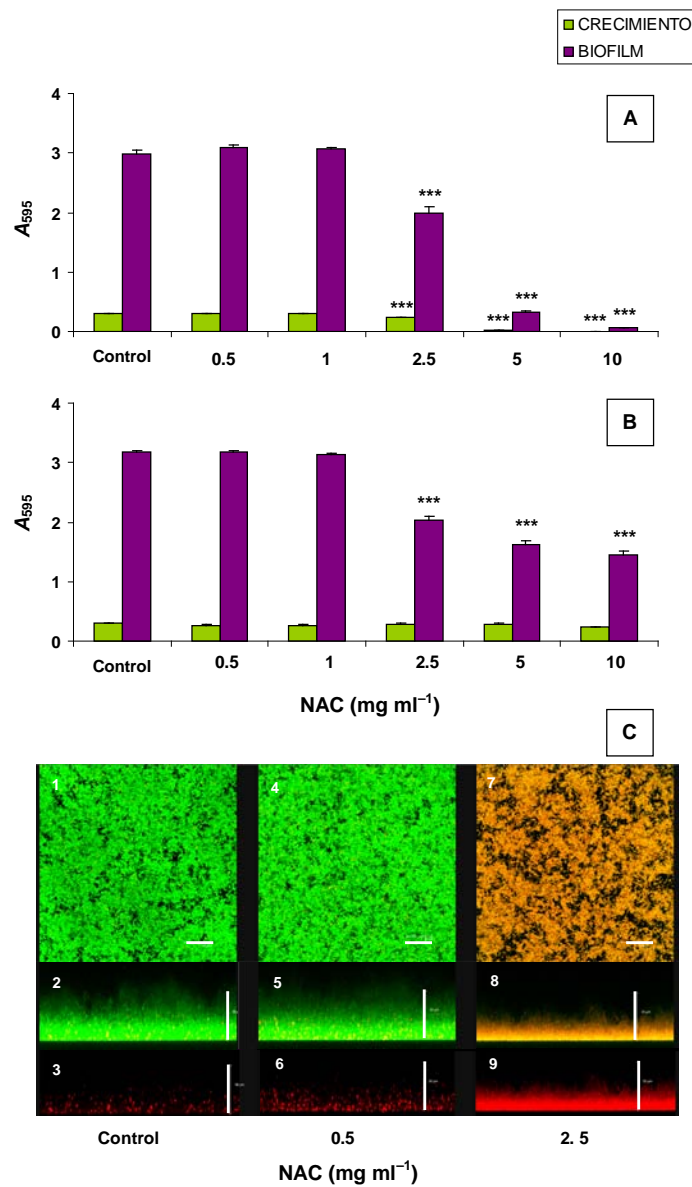


Figura 61. Ensayo del efecto de NAC en los biofilmes de la cepa R6 de neumococo. A. Ensayo de inhibición del biofilm. El compuesto se añadió al cultivo y se incubó durante 6 h a 34°C para permitir la formación del biofilm. B. El compuesto se añadió después de las 6 h de incubación a 34°C y se dejó actuar durante 2 h más a 37°C. C. Imagen CLSM de la viabilidad de los biofilmes de *S. pneumoniae* R6 tratados (paneles 4–9) o no (paneles 1–3) durante 2 h a 37°C. Después del tratamiento, los biofilmes se tiñeron con el *kit* BacLight mostrando bacterias viables (fluorescencia verde) y no viables (fluorescencia roja). Barra, 30 µm. ***, $P < 0.001$.

Se llevaron a cabo ensayos de disgregación de biofilmes de *S. pneumoniae* P046 (*lytA lytC*), con las enzimas líticas de neumococo LytA y LytC y las fágicas Cpl-1 (fago Cp-1), Cpl-7 (fago Cp-7), Pal (fago Dp-1) y Ejl (fago EJ-1) (Fig. 5). La razón de utilizar la cepa P046 reside en que el posible efecto de las enzimas líticas añadidas a los biofilmes no podrá ser atribuido a la acción de las autolisinas endógenas de neumococo presentes en R6 (LytA y LytC). Debido a que las actividades específicas varían de unas enzimas a otras e, incluso, entre diferentes preparaciones de la misma enzima (Díaz *et al.*, 1991, 1992; Sheehan *et al.*, 1997; García *et al.*, 1999a), se llevaron a cabo, en primer lugar, una serie de experimentos destinados a determinar las condiciones óptimas para conseguir la destrucción de los biofilmes. Una vez formado el biofilm, se retiraron las bacterias planctónicas y las adheridas al pocillo se lavaron cuidadosamente con medio CpH8 antes de añadir 200 μ l de tampón SP. La concentración de las enzimas líticas varió entre 150 y 185 U por pocillo en los diferentes ensayos (correspondiendo a 750–925 U ml^{-1}). En cada caso, el pH de tampón se ajustó al óptimo de cada enzima, excepto en el caso de Cpl-7 que se ajustó a pH 6.0 (Tabla 18); las incubaciones con las diferentes enzimas se llevaron a cabo a 37°C (o 30°C para LytC) durante 4 h. Se pudo observar que, en principio y con las excepciones de la lisozima LytC (resultado no mostrado) y la NAM-amidasa Pal, todas las enzimas produjeron una destrucción estadísticamente significativa del biofilm (Fig. 62). La figura 62A muestra cómo las NAM-amidasas LytA y Ejl fueron las más activas produciendo, aproximadamente, un 80% de desintegración del biofilm, seguidas de las lisozimas fágicas Cpl-7 (70%) y Cpl-1 (55%). Sin embargo, ni la lisozima de clara de huevo (HEWL) ni, obviamente, la seroalbúmina bovina (BSA) (utilizadas ambas a 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) produjeron alteración alguna en los biofilmes. Sin embargo, la proteinasa K ocasionó la completa destrucción del biofilm, lo que era previsible sobre la base de los resultados publicados previamente (Moscoso *et al.*, 2006).

Aunque, aparentemente, la enzima Pal no produjo ningún efecto apreciable sobre los biofilmes de *S. pneumoniae*, un examen más detallado mostró que esta NAM-amidasa fágica, después de 4 h de tratamiento, causaba la muerte de, prácticamente, el 90% de las bacterias del biofilm (Fig. 62B). Este hecho indica que Pal es capaz de matar a las bacterias sin ocasionar un efecto sobre la estructura del biofilm detectable mediante ensayos de disgregación en placas multipocillo y tinción con CV. Sin embargo, utilizando vidrio como soporte abiótico y mediante microscopía

confocal, se ha confirmado que la muerte de los neumococos tratados con Pal, lleva consigo una pequeña desintegración del biofilm (Fig. 62C).

Tabla 18. Propiedades bioquímicas de las enzimas líticas de neumococo y sus fagos

Enzima	Cl ₅₀ (mM) ^a	Temperatura óptima (°C)	pH óptimo	Actividad específica (U mg ⁻¹)
LytA	24	37	6.9	4.1×10 ⁵
LytC	30	30	6.0	5.2×10 ³
Pal	2	37	6.0–9.0	3.4×10 ⁴
Cpl-1	2	37	6.0	8.0×10 ⁴
Cpl-7	>150	37	4.5 ^b	6.5×10 ⁴
Ejl	7	37	6.0	1.1×10 ⁵

^a Cl₅₀ indica la concentración de cloruro de colina que produce una reducción del 50% en la actividad enzimática.

^b Aunque la actividad de Cpl-7 a pH 4.5 es el doble que a pH 6.5 (Diaz *et al.*, 1991), este último fue el pH empleado en el presente estudio ya que el primero no es fisiológico para neumococo.

Ya se ha comentado anteriormente que, de acuerdo con los resultados obtenidos con tinción con CV, además de la NAM-amidasa Pal, la lisozima autolítica LytC no parecía afectar a los biofilmes de neumococo. Sin embargo, nos planteamos volver a examinar el efecto de LytC utilizando CLSM, a la vista de los resultados obtenidos con la Pal y comentados en el párrafo anterior. Una vez más y de manera análoga a lo observado con Pal, los resultados demostraron la existencia de un fuerte efecto bactericida de la lisozima LytC sobre el biofilm neumocócico, sobre todo tras 4 h de tratamiento (Fig. 63).

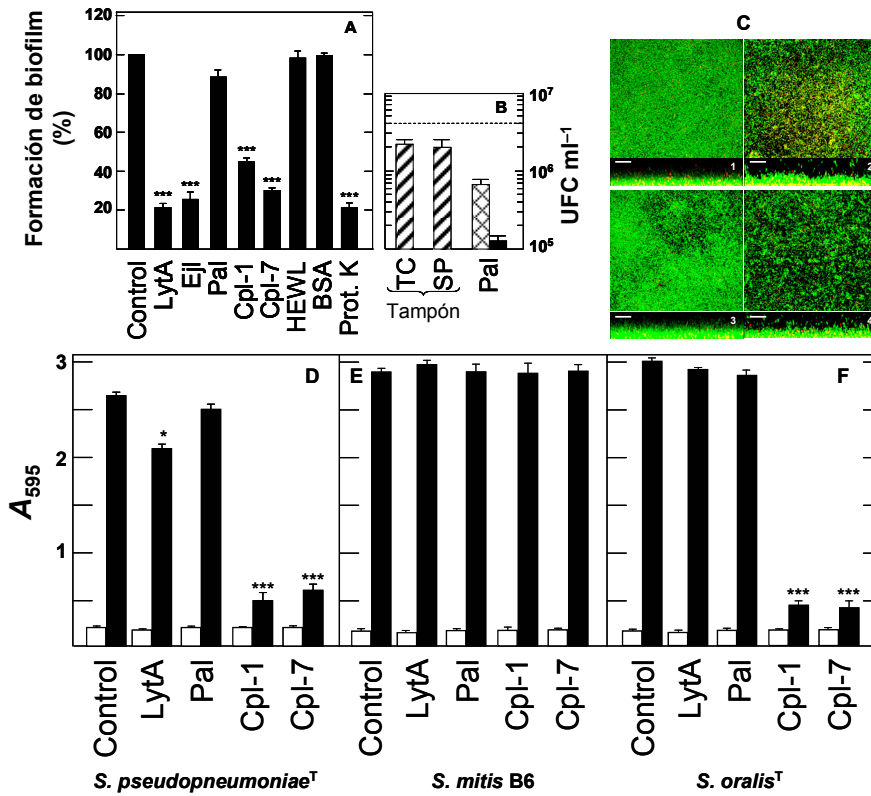


Figura 62. Desintegración de biofilmes estreptocócicos por enzimas líticas de pared. A. Los biofilmes formados por *S. pneumoniae* P046 se lavaron con medio CpH8 y se incubaron a 37°C durante 4 h con, aproximadamente, 800 U ml⁻¹ de la enzima correspondiente en tampón SP. La formación de biofilm fue cuantificada mediante tinción con CV. El porcentaje de formación de biofilm se normalizó con el control (muestra incubada en ausencia de enzima). Otros experimentos incluyeron la adición de 100 µg ml⁻¹ de HEWL, BSA, o proteinasa K. B. Muerte celular en los biofilmes de *S. pneumoniae* P046 causada por incubación con 800 U ml⁻¹ de Pal a 37°C durante 2 (barra con líneas entrecruzadas) o 4 h (barra negra). Los biofilmes control (barra rayada) fueron incubados durante 2 h bien en tampón SP o en tampón TC. La línea discontinua indica la viabilidad celular (UFC ml⁻¹) de los biofilmes antes de la adición de las enzimas líticas. C. Imagen CLSM de la viabilidad de los biofilmes de *S. pneumoniae* P046 tratados (paneles 2 y 4) o no (paneles 1 y 3) con 800 U ml⁻¹ de Pal durante 2 (paneles 1 y 2) o 4 h (paneles 3 y 4). Barra, 20 µm. D–E. Efecto de las enzimas líticas de pared en los biofilmes de *S. pseudopneumoniae*^T, *S. mitis* B6 y *S. oralis*^T. Los biofilmes formados por estas cepas fueron tratados en condiciones idénticas a las mencionadas anteriormente para neumococo. Barras blancas y negras indican, respectivamente, crecimiento y formación de biofilm. En todos los paneles, los resultados representan la media ± error estándar de, al menos, cuatro experimentos independientes, cada uno de ellos realizados en triplicado. Los resultados marcados con asteriscos son estadísticamente significativos (*, *P* < 0.05; ***, *P* < 0.001) comparados con el control.

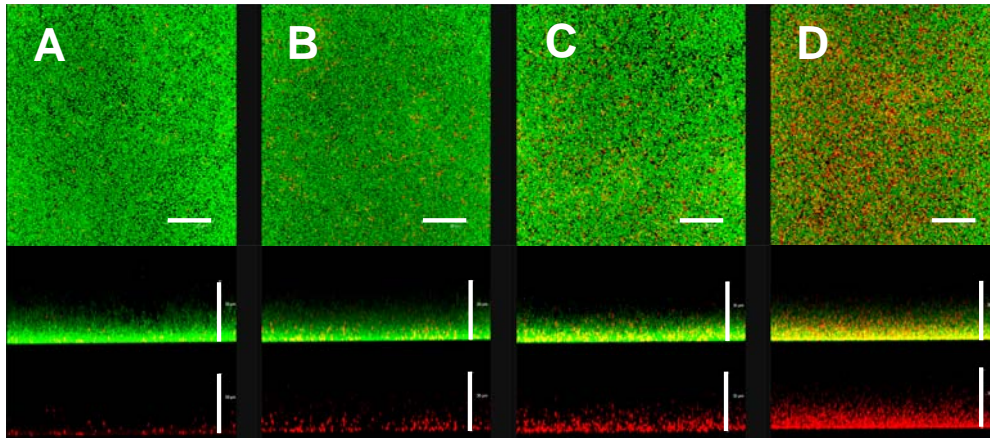


Figura 63. Imágenes de CLSM mostrando la viabilidad de los biofilmes de *S. pneumoniae* P046 tratados (paneles C y D) con LytC (185 U ml^{-1}) durante 2 h (panel C) y 4 h (panel D) a 30°C . En los paneles A y B se muestran sendos biofilmes tratados en paralelo con tampón SP, pH 7.0 (panel A) o pH 6.0 (panel B). Después del tratamiento, los biofilmes se tiñeron con el *kit* BacLight mostrando bacterias viables (fluorescencia verde) y no viables (fluorescencia roja). Barra, $30 \mu\text{m}$.

Las enzimas fágicas Cpl-1 y Cpl-7 fueron muy efectivas en la disgregación de los biofilmes de *S. pseudopneumoniae*^T y *S. oralis*^T y se observó algún pequeño efecto de la NAM-amidasa LytA sobre el biofilm de *S. pseudopneumoniae*^T (Figs. 62D y F). Sin embargo, el biofilm de *S. mitis* B6, que es el único aislado de los que disponemos de esta especie que forma biofilm, presentó algunas peculiaridades ya que no se pudo destruir mediante el tratamiento con proteinasa K (resultado no mostrado) o las enzimas líticas ensayadas (Fig. 62E).

Resultados previos de nuestro laboratorio habían mostrado que las enzimas líticas fágicas Cpl-1 y Pal actuaban sinérgicamente en un modelo murino de peritonitis-sepsis, esto es, la combinación de Cpl-1 y Pal era más efectiva, a la hora de prolongar la supervivencia de los ratones infectados con neumococo, que cada una de las enzimas usadas por separado (Jado *et al.*, 2003). No obstante, la técnica del “Tablero de damas” o *checkerboard* (Eliopoulos y Moellering, 1996) no pudo confirmar la existencia de tal sinergia *in vitro* (Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007a). Por otra

parte, se ha observado que una terapia intraperitoneal con LytA o una dosis alta de Cpl-1 es capaz de reducir notablemente la población bacteriana en un modelo murino de sepsis, aunque LytA mostró la mayor efectividad por vía intravenosa (Rodríguez-Cerrato *et al.*, 2007b). En el presente estudio, observamos que el efecto combinado de cantidades limitantes de LytA y Cpl-1 mostró un efecto disgregador de los biofilmes de neumococo mayor que cada una de las enzimas por separado (Fig. 64).

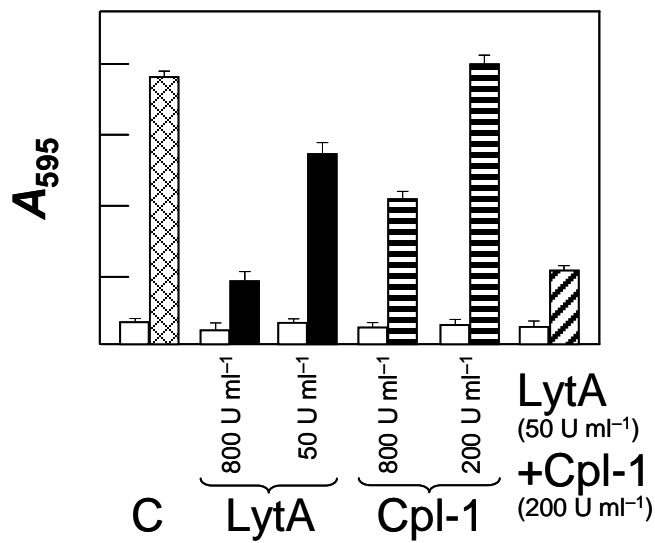


Figura 64. Destrucción de biofilmes de *S. pneumoniae* por la acción combinada de LytA y Cpl-1. Los biofilmes de *S. pneumoniae* P046 fueron tratados con LytA o Cpl-1 en tampón SP, pH 6.5 a 37°C durante 4 h. También se empleó una mezcla de ambas enzimas en concentraciones no saturantes. Se muestra asimismo un cultivo no tratado (C). Las barras blancas corresponden al crecimiento.

V. DISCUSIÓN

1. APROXIMACIÓN A LAS BASES GENÉTICAS DE LA FORMACIÓN DEL BIOFILM DE *S. PNEUMONIAE*

Hasta el momento, el potencial modo de vida sésil de *S. pneumoniae* apenas ha sido investigado y, sin embargo, la otitis media, la neumonía y la meningitis son enfermedades neumocócicas que parecen estar asociadas con la formación de biofilmes. Para comprender las bases genéticas de la formación de biofilmes en *S. pneumoniae*, hemos aislado y caracterizado mutantes de inserción que, o son defectivos en la formación de biofilmes o, por el contrario, muestran un incremento en su formación respecto a la cepa control. Lo primero que llama la atención de los resultados obtenidos es que, en la genoteca de R6, se obtuvo un número más elevado de mutantes que forman un biofilm significativamente menor que la cepa silvestre, que en la genoteca de M32; con esta cepa, la mayoría de los mutantes obtenidos forman más biofilm. Ello puede deberse a diferencias del fondo genético en el que está construida cada genoteca (a pesar de que M32 es un descendiente, aunque lejano, de R6) (López *et al.*, 1986). La cepa *S. pneumoniae* R6 es una buena formadora de biofilm (utilizando el sistema *in vitro* empleado en esta Tesis) y ha sido usada como control en la formación de un buen biofilm. Parece razonable, por tanto, que la mayoría de los mutantes sean menos eficaces en la formación de biofilm. Además, esta cepa posee activas las dos autolisinas de neumococo (LytA y LytC) y siempre habrá un máximo de formación de biofilm en estas condiciones porque, cuando el biofilm madure después de bastantes horas de cultivo, se producirá la autólisis espontánea y, en consecuencia, se irá destruyendo el biofilm formado previamente. Por el contrario, la cepa M32, al ser un mutante *lytA*, por un lado forma menos biofilm que la cepa R6 y, por otro, al no sintetizar la NAM-amidasa LytA, no se autolisa. Por tanto, parece razonable que, tal como se ha diseñado el experimento, la mayoría de los mutantes de esta genoteca sean mejores formadores de biofilm que su cepa parental. Durante el desarrollo de esta Tesis, Muñoz-Elías y cols. (2008) construyeron una genoteca con mutantes de inserción con esta misma metodología pero usando como fondo genético tanto la cepa capsulada TIGR4 (S4⁺) como un mutante de ésta, no capsulado. Cuando la mutagénesis se llevó a cabo con la cepa original (capsulada), sólo se aislaron dos tipos de mutantes alterados en la formación de biofilm: cinco mutantes no capsulados (con mutaciones en el gen *cap/cps4E* del *cluster* capsular) y que formaban más biofilm y dos mutantes *lytC* que estaban inhibidos en su capacidad de formación de biofilm; estos resul-

tados confirmaban plenamente resultados previos de nuestro laboratorio (Moscoso *et al.*, 2006). Además, hay que subrayar el hecho de que, en el transcurso de esta Tesis, también se obtuvo un mutante *lytC* con menor capacidad de formación de biofilm (TRL_Kan29) (Tabla 9). Todo ello confirma que esta lisozima es importante en la formación de biofilmes por parte de *S. pneumoniae* (véase más adelante).

Hay que resaltar el hecho de que, de los 49 mutantes diferentes identificados en la genoteca obtenida con el mutante no capsulado (cepa AC353; TIGR4 S4⁻) que mostraban alteraciones en su capacidad de formación de biofilmes (Muñoz-Elías *et al.*, 2008), sólo uno coincidió con los obtenidos en esta Tesis. La inserción aparentemente común corresponde a la localizada en la región del promotor del gen *spr0607* (mutante TRL_Spc25) (Fig. 10) (mutante 5F10; gen *SP_0694* en TIGR4). Tanto en nuestro caso como en el de Muñoz-Elías y cols. (2008), la inserción del transposón en esta región produjo una inhibición en la formación de biofilm (véase una discusión más detallada de este tema más adelante).

Con la excepción de las inserciones en los genes *spr1651* y *spr1925* que se han propuesto como genes esenciales condicionales (Bijlsma *et al.*, 2007), el resto de las inserciones no afectan a genes considerados como esenciales y, aproximadamente, el 50% de las proteínas que están afectadas por la inserción del transposón, se expresan *in vivo*, como ya se comentó en el apartado 1.1.3 de Resultados.

En las dos genotecas hemos encontrado mutantes relacionados con el metabolismo de carbohidratos (en sentido amplio), donde un mutante forma un mejor biofilm (TRL_Kan47) y otros muestran una reducción en su formación (TRL_Spc9, TRL_Spc66 y TRL_Kan30) (Tabla 9). El mutante TRL_Spc9, tiene interrumpido el gen *glk* (*spr1519*) que se induce durante el desarrollo de la meningitis (Orihuela *et al.*, 2004). El producto de este gen es una proteína de la familia ROK (*bacterial Repressors, uncharacterized Open reading frames, sugar Kinases*) (PF00480) que incluye quinasas de azúcares, represores transcripcionales que responden a la presencia de carbohidratos y muchas proteínas de función desconocida (Conejo *et al.*, 2010). Las quinasas ROK contienen un motivo conservado de unión a ATP en posición N-terminal con la secuencia DxGxT (Holmes *et al.*, 1993) que, en el caso de Spr1519, corresponde a los residuos Asp8–Thr12 (DIGGT), mientras que los represores de esta misma familia poseen una extensión N-terminal que contiene un motivo hélice-giro-hélice de unión a ADN (Conejo *et al.*, 2010). Aunque en la actualidad hay más de 5000 proteínas anotadas como miembros de la familia ROK, sólo una minoría de ellas han sido caracterizadas estructuralmente (Nocek *et al.*, 2011). En

la figura 65 se muestra un alineamiento múltiple de Spr1519 y dos de estas proteínas, la fructoquinasa YdhR de *Bacillus subtilis* (números de acceso O05510 y 3LM9) (Nocek *et al.*, 2011) y una glucoquinasa de *Enterococcus faecium* (Q830J4 y 2QM1) (resultados no publicados) en el que se han señalado algunas de las características estructurales más importantes de estas dos proteínas. Aunque la mayor parte de los motivos y residuos de importancia están conservados en Spr1519, es notable la aparente ausencia del motivo CxCGxxGCx(E/D) (o CxxHxxCx(E/D, en las fructoquinasas) implicado en la unión al Zn²⁺. Además, en el motivo ExGH, His161 ha sido sustituida por Tyr, aunque la significación precisa de este hecho, que tiene lugar en algunas bacterias del filo *Firmicutes*, es desconocida (Conejo *et al.*, 2010).

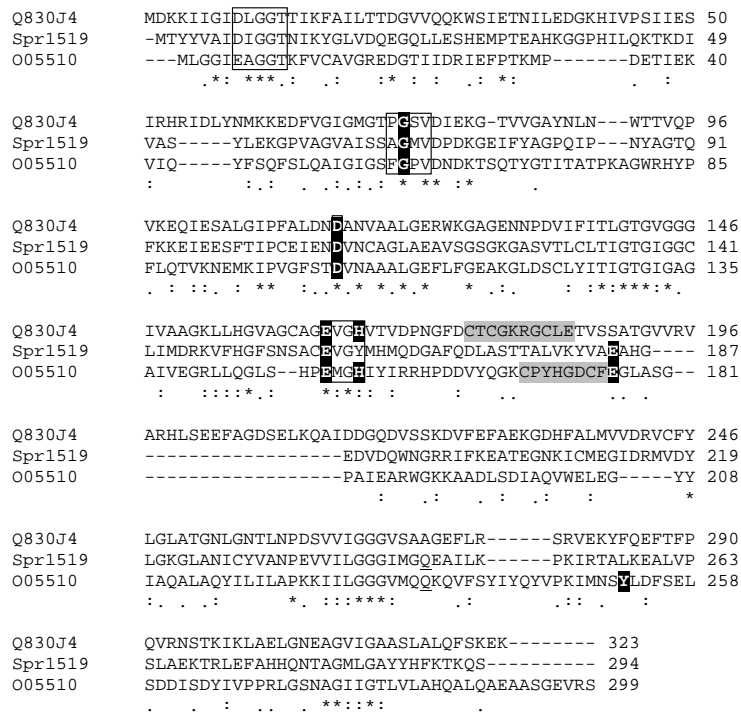


Figura 65. Alineamiento múltiple de Spr1519 y dos proteínas de la familia ROK de estructura tridimensional conocida. Las regiones importantes para la unión al ATP (DxGxT), el bucle del sitio activo (PG o FG) y el motivo ExGH que interacciona con los residuos 2' y 3'-OH del azúcar se muestran recuadradas. Los aminoácidos que interaccionan con el azúcar se indican en letras blancas sobre fondo negro y los que están implicados en la unión al Zn²⁺ se resaltan sobre fondo gris. En Spr1519, el Asp109 corresponde al residuo catalítico.

Aunque se desconoce cuál es el carbohidrato que reconoce Spr1519, se puede especular que se podría tratar o de un azúcar esencial para la formación del exopolisacárido de la matriz del biofilm o de alguno de sus precursores metabólicos; así se explicaría que el mutante TRL_Spc9 forme menos biofilm que la cepa silvestre. Lo mismo puede estar sucediendo con el mutante TRL_Spc66 (*lacG*). Es importante resaltar que el producto de este gen (Spr0424) es, muy probablemente, una GH (Tabla 15). Por su parte, el mutante TRL_Kan30 contiene una inserción en posición 3' del gen *spr0506* (*bglH*) (Tabla 9 y Fig. 10) y, como la inserción va dirigida en dirección opuesta a la transcripción del gen, es muy posible que interfiera en la transcripción del mismo. Es bien conocido que el minitransposón *mariner* contiene un promotor fuerte que dirige la transcripción del gen de resistencia. Así, este promotor puede estimular la transcripción de genes situados en la misma orientación y en posición 3' y, eventualmente, reprimir la de los situados en orientación contraria (Håvarstein *et al.*, 2006). Spr0506 es, al igual que Spr0424, una de las proteínas incluidas en la Tabla 15 de enzimas con actividad sobre carbohidratos (GH1). En cambio, en el mutante TRL_Kan47 —que forma mayor biofilm que la cepa silvestre— el minitransposón se encuentra insertado entre los genes *spr0065* (*galM*) y *spr0066* (Tabla 9). De manera análoga al caso del mutante TRL_Kan30 ya comentado, el minitransposón está localizado en posición 3' del gen *spr0065* y en orientación opuesta al mismo (Fig. 10). GalM es, muy probablemente, una aldosa 1-epimerasa (EC 5.1.3.3; mutarrotasa) que cataliza rápidamente la conversión de β -D-Gal en α -D-Gal. La actividad de esta enzima es vital para el metabolismo de la lactosa puesto que la hidrólisis de este azúcar por la β -galactosidasa genera β -D-Gal, mientras que el sustrato de la galactoquinasa es α -D-Gal. De hecho, el característico fenotipo Gal-negativo de la mayoría de cepas de *Streptococcus thermophilus* es debido a que *galM* se transcribe de manera poco eficiente en esta especie (Vaillancourt *et al.*, 2008).

Se ha descrito que, en diversas bacterias, algunas metalopeptidasas están implicadas en la formación de biofilmes bacterianos y en la virulencia al controlar la cantidad de proteína extracelular necesaria para la formación de un buen biofilm (Bove *et al.*, 2011; Cathcart *et al.*, 2011). Como ya se dijo en la Introducción de esta Tesis, en la matriz del biofilm de *S. pneumoniae* existe un componente proteico muy importante implicado tanto en la formación como en el mantenimiento del biofilm (Moscoso *et al.*, 2006). En las genotecas realizadas en esta Tesis, se caracterizaron dos mutantes de inserción en genes que codifican metalopeptidasas (TRL_Kan31 y

TRL_Spc105) y una inserción localizada en la zona intergénica (TRL_Spc25) (Tabla 9) (véase más arriba). Una de las posibles funciones de estas metalopeptidasas podría ser hidrolizar las proteínas extracelulares del biofilm e impedir la formación de un buen biofilm. El mutante TRL_Spc105, tiene interrumpido el gen *spr0607* que codifica una metalopeptidasa de membrana (Kwon *et al.*, 2011) y forma un buen biofilm, indicando que esta enzima está implicada en la hidrólisis de las proteínas de la matriz del biofilm. En TRL_Spc25, por el contrario, el minitransposón está localizado entre los genes *spr0606* y *spr0607* y, de manera más precisa, entre el promotor y el codón de iniciación del gen *spr0607* (Figs. 9 y 10). Es previsible que, como ya se explicó anteriormente, dado que el promotor presente en el transposón se encuentra orientado en la misma dirección que el gen *spr0607*, la inserción esté promoviendo la transcripción de dicho gen. Por tanto, el aumento en la biosíntesis de la metalopeptidasa, aumentaría la destrucción de las proteínas de la matriz extracelular explicando por qué el mutante TRL_Spc25 forma un biofilm menor que la cepa silvestre. Según los análisis realizados con los programas TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) y SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), la metalopeptidasa DapE (Spr0148), cuyo gen se encuentra interrumpido en el mutante TRL_Kan31, es intracelular, dado que no posee ningún dominio transmembrana ni péptido señal. Por ello, pensamos que no actuaría directamente sobre las proteínas de la matriz del biofilm directamente y se desconoce cuál podría ser su participación en la formación del biofilm neumocócico.

El mutante TRL_Spc4 (*phtE*) muestra una disminución del orden de un 25% en la formación de biofilm con respecto a la cepa silvestre (Tabla 8). El gen *spr0908* codifica la proteína E de la familia de proteínas con triada de histidinas (HxxHxH) y se encuentra localizada en la superficie celular (Adamou *et al.*, 2001). Esta proteína ha sido analizada como posible candidata para la formulación de una nueva vacuna proteica contra *S. pneumoniae* (Ogunniyi *et al.*, 2007). El requerimiento de PhtE para la formación óptima de biofilm en neumococo no había sido observado previamente.

El mutante TRL_Spc88, que contiene el transposón insertado entre los genes *spr1762/comM* y *spr1763/plcR* (Figs. 9 y 10), es un buen formador de biofilm (Tabla 8). El transposón se encuentra insertado entre los posibles promotores de *comM* y el codón de iniciación del gen y en orientación opuesta al mismo. Aunque en la figura 10 se indican las secuencias de dos posibles promotores de *comM*, hay que hacer notar el hecho de que, dentro de la secuencia repetida Box_CBA (resaltada

en fondo gris en la Fig. 10), se encuentra la secuencia TGTTTTGAG que es muy similar a la descrita por Llull y cols. (2001a) (TGTTTTAGG) y que, además de ser similar a la región -10 extendida de los promotores de neumococo (Sabelnikov *et al.*, 1995), posee capacidad promotora demostrada experimentalmente. En cualquier caso, la inserción y orientación del minitransposón debería inhibir la transcripción de *comM* que, como ya se ha señalado anteriormente, codifica el factor de inmunidad de los neumococos competentes frente a la acción de las enzimas líticas propias y, en particular, de CbpD. Se ha sugerido que ComM podría introducir alguna modificación en el peptidoglicano, en los TAs o ambos —particularmente en la zona de división celular— que bloquearía la acción de las peptidoglicán hidrolasas (Eldholm *et al.*, 2010). Si ello fuera cierto, una disminución (o inhibición completa) de la síntesis de ComM resultaría en una mayor actividad efectiva de LytA, LytC o ambas, dos enzimas líticas requeridas para la formación de biofilmes por *S. pneumoniae*, como ya se ha documentado previamente (Moscoso *et al.*, 2006) así como a lo largo de esta Tesis.

El mutante TRL_Spc111 tiene interrumpido el gen *spr0820* que está anotado como codificante de una posible sacaropina deshidrogenasa, que catalizaría la etapa final de la ruta de α -aminoadipato para la síntesis de lisina. Hasta donde sabemos, esta actividad enzimática ha sido descrita solamente en hongos y euglenoides (Ekanayake *et al.*, 2011) y, en consecuencia, la anotación podría ser incorrecta. De hecho, se ha puesto de manifiesto que las carboxiespermidina deshidrogenasas (CASDHs) han evolucionado a partir de una familia de enzimas que incluyen homoespermidina sintasas, lisina 6-deshidrogenasas, sacaropina deshidrogenasas, aspartato deshidrogenasas y homoserina deshidrogenasas (Shaw *et al.*, 2010). Además, muy recientemente, se ha evidenciado que el producto del gen *spr0820* es realmente una CASDH implicada en la síntesis de espermidina (Hanfrey *et al.*, 2011). De acuerdo con los resultados de estos autores, numerosas bacterias integrantes de la microbiota oral y gastrointestinal humana contienen ortólogos de genes codificantes de CASDH que están localizados, normalmente, en posición 5' de un gen que codifica una carboxiespermidina descarboxilasa (CASDC). En el caso de neumococo, este gen correspondería a *spr0821* (*nspC*) (Fig. 9) que está anotado como codificante de una carboxinorspermidina descarboxilasa (CANSDH), una enzima implicada en la síntesis de noespermidina (Fig. 66). Hay que destacar que, además de estos genes, neumococo, como otras muchas bacterias, también posee un grupo de genes implicados en la captación y transporte de poliaminas denomi-

nados *potAHCD* (*spr1246–spr1243*) (Ware *et al.*, 2005). Asimismo, se ha puesto de manifiesto que mutantes en los genes *spr0816* y *spr0819* o en los genes *pot* están atenuados en modelos murinos de colonización nasofaríngea y neumonía (Shah *et al.*, 2011).

Las poliaminas se encuentran en las células de todos los organismos, tanto eucariotas como procariotas y se ha propuesto que desempeñan funciones importantes en proliferación y diferenciación celular, replicación y reparación del ADN, síntesis de procesamiento de ARN así como en la síntesis de proteínas y el metabolismo (Wallace, 2009). Sin embargo y por lo que respecta a esta Tesis, se ha observado que las poliaminas son esenciales para la formación de biofilmes en diversas bacterias (Karatan y Watnick, 2009). Sólo muy recientemente se ha podido demostrar que, al menos en el caso de *Yersinia pestis*, las poliaminas incrementan la traducción de algunos de los genes implicados en la síntesis del polisacárido extracelular (poli- β -1,6-GlcNAc), componente esencial de los biofilmes (Wortham *et al.*, 2010). En este contexto resulta notable que el mutante TRL_Spc111, que contiene el mini-transposón en el gen que codifica la CASDH, forme más biofilm que la cepa parental (Tablas 8 y 9) cuando el efecto que cabría esperar es el contrario. Sin embargo, Hanfrey y cols. (2011) han observado que mientras que la inactivación del resto de genes de la ruta biosintética de la espermidina elimina la acumulación de esta poliamina en el citoplasma celular, la delección del gen que codifica la CASDH, resulta en un notable (y, hasta la fecha, inexplicado) incremento en la cantidad de espermidina en *Campylobacter jejuni*. Puesto que, al parecer ésta y otras muchas bacterias comparten con neumococo una misma ruta biosintética de poliaminas, es de esperar que el mismo fenómeno tendría lugar en neumococo y ello podría redundar en un incremento en la producción de biofilm, como de hecho se ha observado. Sin embargo, es posible que neumococo posea sistemas peculiares de síntesis de algunas poliaminas ya que se ha descrito la existencia de cadaverina en su citoplasma (Shah *et al.*, 2011) y se ha sugerido que el producto del gen *spr0816* podría ser el responsable ya que podría funcionar, además de como ADC, como lisina descarboxilasa (EC 4.1.1.18) que produce cadaverina a partir de lisina. La multiplicidad de mecanismos enzimáticos que estas enzimas son capaces de llevar a cabo ya ha sido notada (Hanfrey *et al.*, 2011) habiéndose sugerido, además, que el gen que codifica SpdSyn (*spr0819*) podría representar un resto no funcional, lo cual no parece ser el caso en *S. pneumoniae* (Shah *et al.*, 2011).

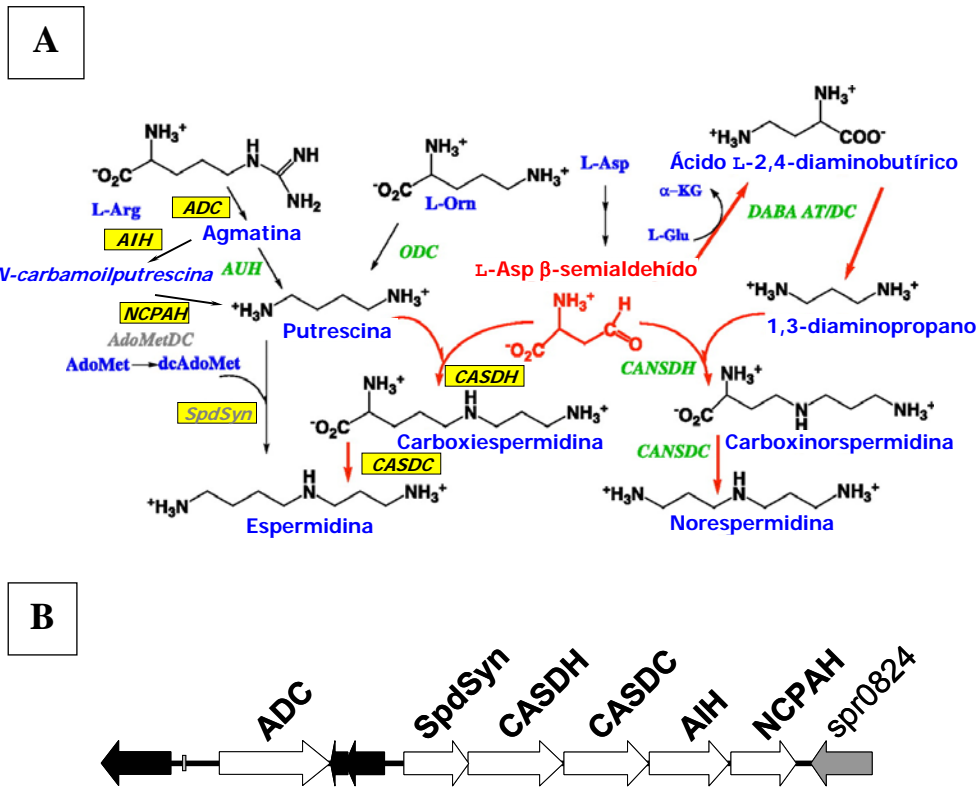


Figura 66. Rutas biosintéticas de poliaminas en diferentes organismos y organización genética en *S. pneumoniae*. A. Las enzimas encuadradas en amarillo son las presentes en neumococo. En verde y en gris se indican, respectivamente, las enzimas presentes o ausentes en la especie modelo *Vibrio cholerae*. En rojo se indica la ruta alternativa descrita para *V. cholerae*. ADC, arginina descarboxilasa (EC 4.1.1.19); AIH, agmatina desiminasa (3.5.3.12); AUH, agmatinasa (EC 3.5.3.11); CANSDC, carboxinorspermidina descarboxilasa; CANSDH, carboxinorspermidina deshidrogenasa; CASDC, carboxiespermidina descarboxilasa; CASDH, carboxiespermidina deshidrogenasa; DABA AT, L-2,4-diaminobutirato aminotransferasa; DABA DC, L-2,4-diaminobutirato descarboxilasa; ODC, ornitina descarboxilasa (EC 4.1.1.17); SpdSyn, espermidina sintasa (EC 2.5.1.16). Modificado de Lee *et al.* (2009). B. En neumococo, los genes responsables de la síntesis de poliaminas están organizados, aparentemente, en dos operones. Las flechas grises y negras indican, respectivamente, genes no implicados en la síntesis de poliaminas y secuencias de inserción. En numerosos genomas de neumococo, el gen (o genes) situados entre los que codifican ADC y SpdSyn está anotado como codificando una proteína relacionada con las pilinas. No obstante, una comparación de secuencias usando el programa *IS finder* (<http://www.is.biotoul.fr/>) indica que, en realidad, este gen codifica la transposasa de una secuencia de inserción de la familia IS110.

Recientemente, se ha sugerido que los neumococos susceptibles a los antibióticos son, en general, mejores formadores de biofilm que los resistentes (Camilli *et al.*, 2011). No obstante, esta conclusión no parece ser de aplicación general ya que se ha observado que, por ejemplo, los neumococos antibiótico-resistentes del clon Greece^{6B}-22 forman más biofilm que los aislados susceptibles del mismo serotipo (Camilli *et al.*, 2011). Tanto en la Introducción de esta Tesis como en el Capítulo 1 de los Resultados, se comentó la importancia del estudio de la tolerancia de neumococo a Van y cuál sería el posible efecto de la misma en la formación de biofilm. Se ha descrito que dosis de Van inferiores a la MIC estimulan la formación de biofilm en *S. epidermidis* llevando a proponer que este hecho podría contribuir al fracaso terapéutico con este antibiótico (Cargill y Upton, 2010). La cepa Tupelo_VT posee una mutación en el gen *ciaH* que codifica una histidín quinasa del sistema CiaRH de transducción de señal de dos componentes implicado en virulencia, competencia y formación de biofilm (Nobbs *et al.*, 2009; Halfmann *et al.*, 2011). Según nuestros resultados (Fig. 11), las cepas VT de *S. pneumoniae* forman un menor biofilm (Fig. 11), lo que podría indicar que, en hábitats en los que formar biofilm suponga una ventaja evolutiva, los neumococos VT (tanto los mutantes *cia* como los *lytA*) pagarían un coste biológico por la adquisición de la tolerancia a Van lo que quizás podría explicar por qué el aislamiento de neumococos VT es infrecuente. Sin embargo y de manera imprevista, la cepa P147 (R6 *ciaH*_{Tupelo_VT}) forma, aproximadamente, tanto biofilm como su progenitora R6 (Fig. 12), poniendo de manifiesto que, además de la mutación en el gen *ciaH*, el fondo genético de la cepa influye en la capacidad de formación de biofilm, en la expresión/regulación del sistema CiaRH o en ambos.

2. PROS Y CONTRAS DEL POLISACÁRIDO CAPSULAR EN LA FORMACIÓN DEL BIOFILM

Desde hace años, se ha estudiado el papel del CPS en la adhesión de neumococo a las células eucariotas, demostrando que es inversamente proporcional a la cantidad de dicho polisacárido (Talbot *et al.*, 1996; Selinger y Reed, 1979; Adamou *et al.*, 1998). Por otra parte, los biofilmes se asociaron a la patogénesis de la bacteria, generalmente por el incremento de la resistencia a los antimicrobianos y los mecanismos de defensa del hospedador. Se han detectado biofilmes bacterianos en la mucosa del oído medio de niños con otitis media crónica (Hall-Stoodley *et al.*, 2006) y en la mucosa de los senos paranasales de pacientes con rinosinusitis crónica (San-

derson *et al.*, 2006). La presencia de biofilmes en la mucosa de individuos sanos ha sugerido, sin embargo, que esos biofilmes podrían funcionar simplemente como colonizadores (Sanderson *et al.*, 2006). En nuestro laboratorio se ha demostrado que el CPS es una barrera física que impide o, al menos, dificulta, las primeras etapas de formación de biofilm de neumococo ya que los aislados clínicos capsulados y los transformantes capsulados isogénicos forman un menor biofilm que la cepa no capsulada (Moscoso *et al.*, 2006). Similares resultados han sido demostrados en otras bacterias (Joseph y Wright, 2004; Yi *et al.*, 2004; Davey y Duncan, 2006). La pérdida del CPS modifica las propiedades fisicoquímicas de la superficie bacteriana porque una variedad de proteínas de superficie asociadas a adhesión y virulencia podrían quedar expuestas y facilitar las interacciones entre el microorganismo y el sustrato y/o otra bacteria (Swiatlo *et al.*, 2002).

Para ampliar el estudio del papel del CPS en la formación de biofilm, se eligieron los serotipos 1 y 3, debido a su incidencia en IPD en niños (Picazo *et al.*, 2011). Ambos serotipos forman un biofilm reducido en comparación con una cepa no capsulada. Cuando se incubó una cepa de *S. pneumoniae* de serotipo 3 en condiciones óptimas para la formación de biofilm se observó que, aproximadamente, el 25% de los neumococos del biofilm daban lugar a colonias de pequeño tamaño en placas de agar-sangre. En conjunto, podemos diferenciar 3 tipos de morfologías coloniales en los biofilmes formados por *S. pneumoniae* serotipo 3: a) colonias grandes y mucosas (1.5 mm de diámetro, aproximadamente) similares a las de la cepa parental capsulada; b) colonias de tamaño intermedio (0.7 mm de diámetro, aproximadamente) parcialmente mucosas, y c) colonias pequeñas no mucosas (< 0.3 mm de diámetro) (Fig. 15). En general, la mayor capacidad de formar biofilmes está directamente relacionada con una reducción tanto en el tamaño de la colonia como en las cantidades relativas de CPS (Fig. 19). No obstante, se observó que el grupo d de mutantes formaba pequeñas colonias no mucosas (Fig. 15) pero era incapaz de formar un buen biofilm (Fig. 20), a pesar de sintetizar solo un 10% de CPS tipo 3. En este grupo de mutantes existe un cambio de un aminoácido (Thr83 por Ile) en Cap3A y, previsiblemente, ello causa una disminución en la biosíntesis de CPS. El residuo Thr83 de Cap3A (UDP-glucosa deshidrogenasa) (Arrecubieta *et al.*, 1994, 1996a) forma un puente de hidrógeno fuerte con el anillo de nicotinamida del NAD(H), como se deduce de la estructura tridimensional de la enzima homóloga (54% de identidad; 72% de similitud) de *S. pyogenes* (Campbell *et al.*, 2000). Curiosamente, la distancia entre los átomos OG1 de Thr83 y NO3* de NAD(H) (2.5 Å) es

la más pequeña de todos los átomos que forman puentes de hidrógeno que forman enlaces entre la enzima y el NAD(H) (Campbell *et al.*, 2000). Por otra parte, la alineación de las estructuras primarias de UDP-glucosa deshidrogenasas bacterianas de 68 géneros diferentes de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas reveló que la Thr83 es uno de los 76 residuos (el tamaño medio de las UDP-glucosa deshidrogenasas bacterianas es de 390 aminoácidos) que están estrictamente conservados en todas estas enzimas (Tabla 19). En conjunto, estos datos ponen de manifiesto la importancia de la Thr83 en el funcionamiento de Cap3A y proporcionan una explicación plausible a la reducción en la producción de CPS en el grupo d de mutantes. No obstante, aún no está claro por qué el mutante Cap3_17 (grupo d), que sintetiza sólo pequeñas cantidades de CPS, muestra una capacidad reducida en la formación de biofilm.

Tabla 19. Aminoácidos conservados en UDP-glucosa deshidrogenasas bacterianas^a

Localización ^b	Aminoácidos ^c
t	G7
α 1	G9, Y10, V11, G12
β 2	V25
α 3	D47
β 3	A63
t	P82, T83
β 5	Y85
β 6	F92
t	S117, T118, P120
β 8	F138
t	P140, E141, F142, L143, R144, E145, A148
α 7	D151, L153
t	P155, S156, R157
α 9	E199, A200, E201, K204 , L205, F206, N208, L211, A212, R214, F218, N219, E220, D222
t	R244, G246, Y249, N250, N251, P252, S253, F254, G255, G257, G258
α 11	Y259, C260, L261, P262, K263, D264, Q267
t	P276
α 12	N287, R290, K291
β 11	G313
Ω -loop	L317, M319, K320, S323, N325, R327
t	E349, P350
t	N380, R381
t	K392

^a Alineamiento múltiple de UDP-glucosa deshidrogenasas bacterianas de: *Acinetobacter* (CAG67052); *Actinobacillus* (ABR73436); *Aeromonas* (ABK38097); *Alcanivorax* (CAL16380); *Alteromonas* (ACG6-

DISCUSIÓN

5306); *Arcobacter* (ABV66924); *Bacillus* (EDP81245); *Bacteroides* (EDU99369); *Bifidobacterium* (EDN82492); *Caminiobacter* (EDM23184); *Campylobacter* (CAI38914); *Carnobacterium* (EDP68102); *Chlorobaculum* (ACF12116); *Citrobacter* (ABV11909); *Clostridium* (EDS75375); *Collinsella* (EBA40338); *Colwellia* (AAZ26971); *Comamonas* (EAV14017); *Corynebacterium* (CAF19074); *Desulfuromonas* (EAT16120); *Dinoroseobacter* (ABV95589); *Dorea* (EDM62920); *Enterobacter* (ABP61308); *Enterococcus* (EAN09675); *Erwinia* (CAG76046); *Escherichia* (AAV74556); *Eubacterium* (EDP10480); *Exiguobacterium* (ACB62072); *Faecalibacter* (EDP20413); *Francisella* (EDN36542); *Fulvimarina* (EAU41189); *Idiomarina* (AAV81379); *Janibacter* (EAP97390); *Klebsiella* (BAD03946); *Lactobacillus* (ABD99787); *Lactococcus* (AAP32720); *Limnobacter* (EDM85026); *Marinomonas* (EAQ66270); *Moritella* (EDM67452); *Nitrosomonas* (CAD85254); *Oceanibulbus* (EDQ03012); *Oenococcus* (ABJ57581); *Parabacteroides* (ABR42219); *Pasteurella* (AAK02860); *Photobacterium* (EAR57037); *Propionibacterium* (AAT82348); *Proteus* (CAR46256); *Providencia* (EDU61555); *Pseudoalteromonas* (CAI85541); *Psychrobacter* (ABQ93230); *Psychromonas* (EAS37734); *Raoultella* (AAQ82924); *Reinekea* (EAR08581); *Roseobacter* (EBA14590); *Ruegeria* (AAN05158); *Ruminococcus* (EDM86527); *Saccarophagus* (ABD81375); *Salmonella* (ACF89974); *Shewanella* (ABX50184); *Shigella* (ACD09673); *Sphingopyxis* (ABF53276); *Streptococcus* (CAA87403); *Sulfurihydrogenibium* (ACD67100); *Sulfurimonas* (ABB45242); *Thermosiphon* (ABR30927); *Thiomicrospira* (ABB42102); *Vibrio* (ACH64823); *Xanthomonas* (CAJ25436).

^b Estructuras secundarias: α , α -hélice; β , lámina β ; t, giro.

^c Los aminoácidos que interactúan con ácido UDP-glucurónico están subrayados; los residuos que forman puentes de hidrógeno con NAD(H) están en cursiva; los implicados en el centro activo se muestran en negrita y los que forman puentes de hidrógeno con la pareja del dímero aparecen sobre un fondo gris. La numeración de los residuos corresponde a la de la enzima de *S. pyogenes* (Campbell *et al.*, 2000).

Se encontró una variedad de mutaciones (polimorfismos en un único nucleótido, deleciones y duplicaciones) entre los distintos mutantes capsulares (Fig. 17 y Tabla 13) pero no se observaron reversiones al fenotipo capsulado. Estos resultados contrastan con lo descrito anteriormente por Waite y cols. (2001) quienes, analizando biofilmes de neumococos de serotipo 3 formados en cultivo continuo sobre filtros Sorbarod, aislaron mutantes no capsulados que tenían duplicaciones en tándem y reversibles en el gen *cap3A*. Se describieron resultados similares con los serotipos capsulares 8 y 37 utilizando el mismo sistema (Waite *et al.*, 2003). Sin embargo, cuando los biofilmes eran producidos en reactores de flujo continuo (Allegrucci y Sauer, 2007), la mayoría de los mutantes capsulares poseían deleciones del operon *cap3* completo (Allegrucci y Sauer, 2007). Además, biofilmes formados en filtros de membrana dieron lugar a diferentes tipos de mutantes capsulares de tipo 3 en crecimiento prolongado (4–7 días) (McEllistrem *et al.*, 2007). Once de estas cepas con-

tenían polimorfismos en un único nucleótido en el gen *cap3A*, otro tenía una mutación en la caja -10 del promotor (cATAAT) y tres mostraban grandes deleciones en el gen *cap3A* y, en un caso, también en el gen *cap3B*.

Estos resultados, tomados de manera conjunta, sugieren que el método elegido para la formación de biofilm, de alguna manera aún desconocida, modula el tipo de mutaciones capsulares que aparecen en el biofilm. De hecho, existe evidencia experimental que sugiere que las condiciones específicas del medio ambiente más favorable para la formación de biofilmes, entre las que se encontraría la producción aumentada de H₂O₂, podría incrementar sustancialmente la frecuencia de mutación (Pericone *et al.*, 2002; Allegrucci y Sauer, 2008).

Como ya se ha comentado, en la población de los biofilmes formados por neumococos de serotipo 3, se observa una notable heterogeneidad debida a la coexistencia de bacterias capsuladas y mutantes no capsulados. Estos mutantes podrían desempeñar un papel esencial en las etapas iniciales (fijación) de la formación del biofilm. Por su parte, los mutantes de *S. pneumoniae* serotipo 3 que producen cantidades reducidas de CPS (entre 10% y 45%) podrían aparecer preferencialmente en etapas posteriores del desarrollo del biofilm, según lo propuesto por Allegrucci y Sauer (2007). Esta hipótesis concuerda con lo descrito por Briles y cols. (2005) durante la colonización de los tejidos de la mucosa nasal en un modelo murino y está en consonancia con la propuesta de que los neumococos regulan la expresión de la cápsula en la transición del estado de portador nasofaríngeo, asociado con el desarrollo del biofilm, a la enfermedad invasiva (Waite *et al.*, 2003); una propuesta similar ha sido formulada recientemente para los biofilmes de *N. meningitidis* (O'Dwyer *et al.*, 2009). Es notable que, en las fases iniciales de las infecciones neumocócicas, se produce una disminución de la expresión del CPS (Hammerschmidt *et al.*, 2005), seguramente como consecuencia de que *cap/cpsA*, el primer gen del operón capsular neumocócico, se inhibe (hasta en 10 veces dependiendo de la estirpe) durante la formación de biofilmes, en comparación con lo observado en los cultivos planctónicos (Hall-Stoodley *et al.*, 2008).

Analizando la capacidad de formación de biofilm de diversos aislados clínicos de *S. pneumoniae* del serogrupo capsular 19 descubrimos que, tanto los que sintetizan CPS del serotipo 19A como del 19F, forman un buen biofilm; en cambio, los que producen cápsulas de los otros dos serotipos del grupo (19B y 19C) se comportan como el resto de serotipos capsulares, es decir, formando mucho menos biofilm que las cepas no capsuladas (Fig. 24) tal y como se había observado previamente

(Moscoso *et al.*, 2006). Es, no obstante, cierto que, entre las cepas de serotipo 19F analizadas, G54 y SSISP19F/1 forman menos biofilm que las otras cepas del mismo serotipo. Sin embargo, el transformante P192, que contiene los genes capsulares de la cepa G54, forma el doble de biofilm que la cepa clínica (Fig. 24). Ello nos lleva a pensar que las cepas G54 y SSISP19F/1, aunque sintetizan CPS del serotipo 19F, poseen un fondo genético que influye notablemente en la capacidad de formación de biofilm. Esta hipótesis fue confirmada plenamente al analizar el comportamiento de cepas transformantes derivadas de la rugosa M11 pero que sintetizaban CPS de los diferentes serotipos que integran el serogrupo 19 (19F: P191 y P192; 19A: P181; 19B: P182; 19D: P184). Los transformantes con cápsulas 19F o 19A forman un buen biofilm mientras que las cepas P182 y P184 son malos formadores (Fig. 24). Además, la singularidad de los CPSs de los serotipos 19F y 19A se puso más de manifiesto si cabe cuando se observó que la cepa binaria P194 (S19F⁺, S37⁺) formaba menos biofilm que su progenitora P192 (S19F⁺) (Fig. 24).

El hecho de que los neumococos del serotipo 19A sean buenos formadores de biofilm podría explicar su gran capacidad de colonización en comparación con otros serotipos (Laufer *et al.*, 2010) y, en definitiva, su prevalencia en la nasofaringe infantil (Spijkerman *et al.*, 2011), sobre todo después de que, como consecuencia de la vacunación con la PCV7, el número de neumococos de serotipo 19F en los portadores sea mucho menor que en la época prevacunal. De los resultados expuestos en esta Tesis parece evidente que la incapacidad de los neumococos de los serotipos 19B/19C para formar un biofilm comparable al de las estirpes de serotipos 19F/19A reside en el hecho de que, a pesar de compartir un núcleo común, existen diferencias importantes en la estructura del CPS de cada uno de los grupos, tal y como se muestra en la figura 23A.

3. LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL BIOFILM NEUMOCÓCICO

Al comienzo de esta Tesis, se conocía la existencia, en la matriz del biofilm de neumococo, de un componente proteico y de ADN-e extracelular. Sin embargo, con las imágenes de LTSEM obtenidas ahora se observa mucho más claramente la existencia de las EPS (Fig. 25). Con todos los resultados obtenidos en esta Tesis podemos afirmar que, además de confirmar la existencia de proteínas y de visualizar el ADN-e (Fig. 26), resulta muy probable la existencia en dicha matriz de complejos ADN-proteína y, más concretamente, con LytC (Figs. 29 y 35). LytC es una

CBP muy abundante en el medio extracelular de los cultivos de neumococo (Eldholm *et al.*, 2009) y podría estar actuando de forma análoga a la beta toxina de *S. aureus*, que se une al ADN-e y forma una matriz nucleoproteica insoluble que promueve la formación de biofilmes tanto *in vitro* como *in vivo* (Huseby *et al.*, 2010). Los datos experimentales aportados en esta Tesis han mostrado que la unión entre LytC y el ADN-e es bastante fuerte y dependiente de Mg^{2+} . Una vez formado el complejo, sólo la proteinasa K consiguió deshacerlo (Fig. 31). Sobre este punto tenemos que seguir profundizando en estudios futuros ya que sería interesante demostrar su implicación en la formación del biofilm de neumococo y descubrir el papel tan poco conocido que tiene el ADN-e en la matriz de muchos biofilmes. El mecanismo de liberación del ADN-e es desconocido aunque, en otras bacterias como *P. aeruginosa*, se ha descrito que dicha liberación depende de mecanismos de *quorum sensing* (Allesen-Holm *et al.*, 2006). Carrolo y cols. (2010) demostraron que las cepas lisogénicas de neumococo poseen una mayor capacidad de formación de biofilm que aquellas que no lo son. Esta observación es relevante dado que, aproximadamente, el 50% de los aislados clínicos de *S. pneumoniae* portan profagos (Romero *et al.*, 2009b). También se ha observado que cepas defectivas en la biosíntesis de lisinas fágicas o de la autolisina LytA recuperan la capacidad de formación de biofilm cuando se les añade ADN tanto homólogo como heterólogo (Carrolo *et al.*, 2010). Es muy posible que, en neumococo, la liberación del ADN-e sea dependiente de un proceso de autólisis y, por ello, los mutantes en los genes *lytA* y/o *lytC* formen un menor biofilm. No obstante, esta hipótesis deberá ser comprobada en experimentos futuros, ya que hemos visto mediante CLSM que el biofilm formado por un mutante *lytC* posee, aparte de las diferencias ya señaladas en cuanto a la cantidad del mismo, un aspecto indistinguible del de la cepa silvestre en lo que respecta a la tinción con DDAO (datos no mostrados). Los experimentos *in vitro* también han mostrado la existencia de una pequeña (aunque detectable) interacción entre el ADN y LytB o CbpF (Fig. 29); esta última proteína, además, fue capaz de competir con LytC en el ensayo de formación del complejo ADN-LytC (Fig. 34). Se ha mostrado que CbpF es un inhibidor de la actividad peptidoglicán hidrolasa (lisozima) de LytC (Molina *et al.*, 2009). Si ambos procesos estuvieran relacionados podría interpretarse que CbpF se une a LytC por la región (o, al menos, próxima a ella) implicada en la unión de LytC al ADN; no obstante, se requieren experimentos adicionales para poder confirmar o rebatir completamente esta hipótesis.

El componente proteico de la matriz del biofilm de neumococo es importante tanto para la formación como para el mantenimiento del biofilm. El tratamiento con tripsina K o tripsina fue suficiente para inhibir la formación del biofilm así como para causar la disgregación del mismo una vez formado (Moscoso *et al.*, 2006). Por otra parte, hemos mostrado en esta Tesis (Fig. 28) que algunos inhibidores de serín-proteasas como BZA y PMSF producen una inhibición significativa (aunque parcial) en la capacidad de la cepa R6 para formar biofilm, indicando la participación de ciertas serín-proteasas (excluyendo HtrA) en la formación del biofilm neumocócico. En *P. aeruginosa* se ha identificado un inhibidor de la elastasa LasB (una metaloproteasa implicada en virulencia) que reduce la formación de biofilmes y que, además, es capaz de eliminarlos cuando el inhibidor se usa en combinación con antibióticos convencionales (Cathcart *et al.*, 2011). Además, ciertas proteasas controlan la cantidad de proteínas extracelulares necesarias para la formación y mantenimiento de un buen biofilm (Bove *et al.*, 2011; Cathcart *et al.*, 2011). Martí y cols. (2010) han descrito que la sobreexpresión de las proteasas Aur y SspA (que degradan la proteína de superficie Bap necesaria para la formación del biofilm) tiene como consecuencia la inhibición de la formación de biofilm en *S. aureus*. En consecuencia, se puede deducir que hay dos grupos de proteasas que actuarían de manera opuesta en la formación y mantenimiento de los biofilmes, unas que parecen controlar la abundancia de proteínas en la matriz del biofilm, como ocurre en *S. aureus* (Martí *et al.*, 2010) y, otras que afectarían al desarrollo del biofilm al intervenir en procesos intracelulares que activarían la formación del biofilm, como ocurre en *P. aeruginosa* (Cathcart *et al.*, 2011). En esta Tesis hemos observado que el mutante TRL_Spc105, que tiene interrumpido el gen *spr0607* que codifica una metalopeptidasa de membrana (Kwon *et al.*, 2011), forma casi un 60% más biofilm que su progenitora R6 (Tablas 8 y 9 y Fig. 8), indicando que esta enzima está implicada en la hidrólisis de las proteínas de la matriz del biofilm de manera similar a las proteasas Aur y SspA de *S. aureus*. Además, cuando el minitransposón se localizó entre el promotor y el codón de iniciación del gen *spr0607* (Figs. 9 y 10), como sucede en nuestro mutante TRL_Spc25 y en el denominado 5F10 descrito por Muñoz-Elías y cols. (2008), la inserción parece incrementar la transcripción de dicho gen. De ahí que el incremento en la biosíntesis de la metalopeptidasa Spr0607, aumentaría la destrucción de las proteínas de la matriz extracelular explicando por qué ambos mutantes forman un biofilm menor que la cepas progenitoras correspondientes (R6 y TIGR4, respectivamente) (Tablas 8 y 9). Por el contrario, la interrupción, en el mu-

tante TRL_Kan31, del gen *spr1048* que codifica la metalopeptidasa intracelular DapE, causa un 30% de reducción en la formación de biofilm (Tabla 10). Aunque la razón de este fenotipo no es evidente, conviene recordar que la elastasa LasB de *P. aeruginosa* estimula la formación de biofilm mediante la activación por procesamiento proteolítico de una nucleósido difosfato quinasa implicada en la formación de GTP, una molécula requerida para la formación del biofilm (Kamath *et al.*, 1998).

La existencia de un componente polisacárido en la matriz del biofilm neumocócico era desconocida al principio del desarrollo de esta Tesis, aunque se había sugerido la existencia de un polisacárido extracelular sobre la base de experimentos de tinción con azul alciano (Oggioni *et al.*, 2006), un colorante que tiñe glicosaminoglicanos, moléculas formadas por cadenas de unidades de disacáridos (azúcar ácido – aminoazúcar). No obstante, dado que las cepas empleadas en ese estudio fueron D39 y TIGR4, ambas capsuladas y que contienen residuos ácidos en sus respectivos polisacáridos [ácidos glucurónico y pirúvico, respectivamente (Kamerling, 2000)], no se pudo excluir totalmente que fuera el CPS y no un exopolisacárido propio del biofilm el responsable de la respuesta positiva a la tinción. Anteriormente, se había observado una tinción positiva con la lectina WGA en ciertas áreas del biofilm (Donlan *et al.*, 2004). El inconveniente de estos experimentos, es que fueron también realizados con una cepa clínica capsulada y, además, de serotipo no especificado y, por tanto, los residuos detectados podrían pertenecer al CPS, a la pared bacteriana o a un exopolisacárido. Más recientemente, se demostró, mediante una combinación de cinco lectinas que incluían la WGA, la tinción de zonas dentro de un biofilm neumocócico empleando también cepas capsuladas (Hall-Stoodley *et al.*, 2008). Aunque, según estos autores, también se tiñó un biofilm de la cepa no capsulada R6, esos datos no fueron mostrados.

Para evitar las posibles interferencias comentadas, en todos los ensayos realizados en esta Tesis encaminados a demostrar la existencia de un posible polisacárido extracelular en el biofilm neumocócico, sólo se utilizaron cepas de neumococo no capsuladas. En primer lugar, los resultados obtenidos con NaIO_4 (Fig. 36), nos sugirieron la existencia de un polisacárido en el biofilm de neumococo diferente al polisacárido capsular. Además, la utilización de calcoflúor permitió determinar la existencia en los biofilmes (pero no en los cultivos planctónicos) de un β -glicano distribuido por todo el espesor del biofilm (Fig. 37). La utilización combinada de lectinas (ConA, PNA, SBA y WGA) y CLSM fue de gran utilidad. Ninguna de ellas tiñó los cultivos planctónicos de neumococo, aunque SBA y WGA sí tiñeron el biofilm neu-

nocócico (Fig. 39), sugiriendo que en la matriz del biofilm hay residuos accesibles de α - y/o β -GalNAc así como GlcNAc y/o Neu5Ac. Los grupos acetilo son sustituyentes habituales en exopolisacáridos a los que confieren adhesividad y cohesión a los componentes de la matriz de los biofilmes (Flemming y Wingender, 2010). Los resultados obtenidos están en consonancia con los obtenidos por Hall-Stoodley y cols. (2008) quienes utilizaron una mezcla de 5 lectinas (ConA, PNA, SBA, WGA y Gs-II). No obstante y en contraste con nuestros estudios, la utilización conjunta y no individualizada de tales lectinas por parte de estos investigadores impidió la determinación de los residuos a los que se unían las lectinas. La combinación de la lectina WGA con el calcoflúor nos ha permitido poner de manifiesto la existencia de regiones del biofilm específicas para cada uno de estos compuestos, además de evidenciar que éstos también reconocen zonas de la preparación aparentemente libres bacterias (Figs. 40 y 41) lo que apoya aún más la existencia de un proceso de biosíntesis de uno o más polisacáridos específicos del crecimiento en forma de biofilm en *S. pneumoniae*.

El uso de enzimas hidrolíticas sobre los biofilmes de neumococo corroboró los resultados anteriores, ya que, sobre la base de las concentraciones utilizadas en los ensayos, la enzima que mayor disgregación produjo en el biofilm neumocócico fue la quitinasa (90%) (Figs. 42 y 43), confirmando la presencia de residuos de β -GlcNAc en el polisacárido de las EPS. Otra de las enzimas que disgregó considerablemente el biofilm fue la celulasa ($\approx 80\%$) que hidroliza enlaces β -(1,4) entre residuos de glucosa. La mayoría de las enzimas hidrolíticas que disgregaron el biofilm neumocócico actúan sobre enlaces β -(1,4), lo que apoya los resultados obtenidos con el calcoflúor. Por otra parte, la falta de actividad disgregadora mostrada por la DispB sugiere que el tipo de enlace entre las unidades de GlcNAc en el polisacárido del biofilm neumocócico no sería β -(1,6) sino más bien β -(1,4). La posible existencia de un polisacárido en la matriz del biofilm de neumococo formado por residuos de Glc β (1 \rightarrow 4) (celulosa), ha sido descrita en otras bacterias como *Salmonella typhimurium* (Jonas *et al.*, 2007). Además, se ha observado la asociación entre la celulosa de *Salmonella* y la quitina de *Aspergillus niger* en la formación de biofilmes complejos (Brandl *et al.*, 2011). Si éste fuera el caso en neumococo, supondría la existencia, en la matriz del biofilm de *S. pneumoniae*, de dos exopolisacáridos (tipo celulosa y quitina) secretados por la misma bacteria aunque, dada la enorme complejidad química y estructural que poseen los polisacáridos, la existencia de un solo polisacárido que contenga varios componentes y/o tipos de enlaces no puede ser

descartada en el estado actual de nuestros conocimientos. Por otra parte, la pululanasa (EC 3.2.1.41) de *B. acidopullulyticus*, que hidroliza específicamente los enlaces (1→6)- α -D-Glc p (Dinadayala *et al.*, 2004), destruyó muy eficazmente los biofilmes de neumococo (Fig. 45) indicando la existencia de ramificaciones de este tipo en el polisacárido del biofilm. No obstante, hay que tener en cuenta que se ha demostrado que esta pululanasa posee una cierta inespecificidad en el tipo de enlace que hidroliza, como lo demuestra el hecho de su capacidad para eliminar las ramificaciones (1→6)- α -D-Gal p del galactomanano de la goma guar, producida por la leguminosa *Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub. (Shobha y Tharanathan, 2008), un polímero de unidades de β -1,4-D-manopiranosas unidas a residuos de α -1,6-D-galactopiranosas. Analizando conjuntamente los resultados obtenidos con el empleo del calcoflúor (Figs. 37 y 38), y las lectinas SBA y WGA (Figs. 39–41), la actividad disgregadora de la quitinasa/celulasa (Fig. 42) y pululanasa (Fig. 45) y el resultado de los análisis químicos de la fracción soluble en NaOH 1 M (Figs. 49 y 50), se puede afirmar que, en la matriz del polisacárido del biofilm neumocócico, existe uno o más polisacáridos que contienen residuos de Glc β (1→4), GlcNAc β (1→4) junto con, posiblemente, residuos de Gal p . Además, parece probable que el polisacárido (o polisacáridos) contengan ramificaciones de Glc/Gal α (1→6).

Se ha descrito que mutantes en los genes que codifican las neuraminidasas NanA y NanB tienen una reducida capacidad de formar biofilm (King, 2010). Además, estos genes aumentan su expresión en los biofilmes neumocócicos (Oggioni *et al.*, 2006; Trappetti *et al.*, 2009). Se ha sugerido que el ácido siálico libre contribuye a la formación de los biofilmes y podría ser una señal ambiental que promoviera la colonización, un componente de la matriz o ambos (Trappetti *et al.*, 2009). Aunque nuestros resultados son en principio compatibles con la posible existencia de Neu5Ac en la matriz del biofilm de neumococo —ya que éste está compuesto de GlcNAc y GalNAc y ambos componentes podrían estar presentes sobre la base de los experimentos en los que se utilizaron las lectinas WGA y SBA, respectivamente (Fig. 39)—, la falta de efecto apreciable de la adición exógena de NanA apuntaría, en todo caso, a una participación secundaria, al menos en nuestro modelo *in vitro* de biofilm.

La búsqueda de posibles genes responsables de la síntesis del EPS tuvo como resultado la obtención de evidencias experimentales de que los genes que codifican las glicosidasas StrH, EndoD y BgaA (Tabla 16) están implicados de algún modo en la formación del biofilm neumocócico. Las tres glicosidasas actúan sobre residuos

de la matriz del biofilm de neumococo ya identificados en esta Tesis y, por tanto, es lógico que al interrumpir estos genes se vea afectada la capacidad de formación de biofilm (Tabla 16). No obstante, hay que señalar que la adición de EndoD a los biofilmes ya formados no produjo efecto disgregador apreciable. Se ha visto que mutantes en las glicosidasas NanA, NanB, BgaA y BgaC forman un menor biofilm *in vitro*. Los mutantes *bgaA* tienen reducida la capacidad de adhesión a células epiteliales y se piensa que el papel de esta proteína en adhesión es independiente de su actividad enzimática, ya que mutantes en la actividad enzimática de BgaA, no tienen afectada la capacidad de adhesión (King, 2010). Los experimentos de inactivación por minitransposón llevados a cabo a lo largo de esta Tesis no señalan claramente qué gen o genes están implicados en la síntesis del polisacárido del biofilm neumocócico. Sin embargo, ciertos productos génicos parecen desempeñar un papel, siquiera limitado, en dicha síntesis. Así, de las proteínas de *S. pneumoniae* que podrían interactuar con azúcares (Tabla 15), la inactivación de los genes codificantes de las posibles GTs, *spr1223* (GT2), *spr1224* (GT4) y *spr1459* (GT2) originó una pequeña, aunque estadísticamente significativa, disminución de la capacidad de formación del biofilm (Tabla 16). Las GTs de la familia 2 invierten la configuración anomérica del azúcar dando lugar a β -glicósidos, como la celulosa o la quitina, mientras que las GT4 mantienen dicha configuración dando lugar a α -glicósidos (Cantarel *et al.*, 2009).

Resulta evidente que para la identificación detallada de los genes implicados en la biosíntesis del biofilm neumocócico se necesitarán experimentos adicionales tanto de mutagénesis al azar como de inactivación selectiva de los genes mostrados en la Tabla 15 que no han sido estudiados en la presente Tesis. En nuestra opinión, los primeros genes que deberían estudiarse serían los posiblemente implicados en la síntesis de glucógeno y que, por comparación de secuencias, corresponden a los genes *spr1028* a *spr1031*. El almacenamiento de α -glucanos por parte de diversos estreptococos está bien documentado (McFarland *et al.*, 1984). Aunque su papel no está totalmente aclarado, el glucógeno bacteriano es considerado, en general, como un polisacárido de reserva (Ballicora *et al.*, 2003). No obstante, se sabe que este α -glucano posee un papel importante tanto en la patogenicidad de *S. mutans* (Spatafora *et al.*, 1995) como en la formación de biofilmes en *Salmonella* (Bonafonte *et al.*, 2000). El glucógeno es un polímero bastante soluble en agua que está compuesto por hasta cientos de miles de unidades de glucosa unidas, en un 90%, por enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ y, en un 10%, por enlaces $\alpha(1\rightarrow6)$. Aunque se han descrito tres

rutas de síntesis de glucógeno en bacterias, las bacterias Gram-positivas con bajo contenido en G+C utilizan la denominada vía clásica (Chandra *et al.*, 2011) que se inicia con la síntesis de ADP-Glc a partir de Glc-1-fosfato mediante la acción de la enzima ADP-Glc pirofosforilasa (GlgC; posiblemente Spr1030 en neumococo) y su polimerización subsiguiente por la glucógeno sintasa (GlgA; Spr1032) para formar un glucano lineal. La proteína GlgD (Spr1031) parece que aumenta la afinidad y actividad de GlgC (Ballicora *et al.*, 2003). A continuación, éste se transforma en glucógeno por la acción de la enzima ramificante (GlgB; Spr1029) que cataliza la transferencia de oligoglucanos no reductores a la posición 6 de las cadenas lineales. Utilizando una vía biosintética diferente, especies del género *Mycobacterium* sintetizan un α -glucano de localización tanto intracelular como extracelular (cápsula) que es importante para la persistencia del microorganismo *in vivo* (Sambou *et al.*, 2008). Resulta muy interesante que, aunque ambas formas del α -glucano son muy similares en composición y estructura, existen sutiles diferencias entre ellas cuyo significado es desconocido por el momento pero que se ha sugerido que puedan afectar al papel biológico de ambos polímeros (Dinadayala *et al.*, 2008). Otro gen de potencial interés en el estudio de la transferencia de residuos de Glc $\alpha(1\rightarrow6)$ es *spr0948* que se encuentra anotado como codificante de una neopululanasa (EC 3.2.1.135) posiblemente por su homología (50% identidad; 65% similitud; $E < 10^{-180}$) con la correspondiente enzima producida por *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus* cuya estructura tridimensional es conocida (Hondoh *et al.*, 2003). Se ha demostrado que esta enzima es capaz de catalizar cuatro reacciones diferentes, dos de ellas de hidrólisis, $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$, y otras dos de transglicosilación, $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$ (Takata *et al.*, 1992).

LytB es una CBP de *S. pneumoniae* que degrada enlaces en el peptidoglicano de manera localizada y es la responsable de la separación de las células hijas al final de la división celular, evitando así la formación de cadenas (García *et al.*, 1999b; De las Rivas *et al.*, 2002). No se ha demostrado bioquímicamente que LytB sea de hecho una *N*-acetilglucosaminidasa pero su módulo catalítico es similar (30% de identidad sobre unos 175 aminoácidos; $E = 10^{-20}$) al dominio C-terminal de AtIA (una autolisina bifuncional de *S. aureus*) donde reside la actividad *N*-acetilglucosaminidasa (Vollmer *et al.*, 2008). Los mutantes *atlA* de *S. aureus* forman grumos, permanecen unidos entre sí y no forman un buen biofilm (Houston *et al.*, 2011). De forma similar se ha comprobado que los mutantes *lytB* de *S. pneumoniae*, además de formar largas cadenas, presentan una menor capacidad para for-

mar biofilmes que la cepa parental (Moscoso *et al.*, 2006). Nuestros resultados sugieren que la proteína LytB podría desempeñar un papel esencial en las etapas iniciales de la formación del biofilm (Figs. 46 y 47), ayudando a la diseminación de las células hijas sobre la superficie a colonizar y constituyendo así los diferentes sitios de nucleación necesarios para la formación de las microcolonias y el posterior desarrollo del biofilm. La ausencia de LytB impediría la separación de las células hijas y la colonización posterior de la superficie. Por el contrario, un exceso de proteína diseminaría los pequeños *clusters* o agrupaciones celulares necesarias para la formación de las microcolonias. En esta Tesis hemos demostrado que un mutante *lytB* de *S. pneumoniae* incrementa su formación de biofilm cuando se añade hasta $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de LytB purificada. A bajas concentraciones de la enzima, el mutante puede llegar a formar un biofilm similar al de la cepa silvestre pero, si la concentración de la enzima supera $1 \mu\text{g ml}^{-1}$, se inhibe la formación del mismo (Figs. 47 y 48).

Además del ya mencionado “factor señalizador difusible” (un ácido graso *cis* insaturado, implicado, entre otras funciones, en la formación y dispersión de los biofilmes), en algunos microorganismos existe evidencia experimental de que ciertos componentes lipídicos podrían estar relacionados con la formación de biofilmes. Éste es el caso de los glicopeptidolípidos de algunos miembros del género *Mycobacterium* (Schorey y Sweet, 2008). Sin embargo y como ya se ha mencionado, la inactivación por inserción de los genes *fabM* (mutante P177) o *fabT* no ocasionó ninguna alteración en la formación del biofilm en *S. pneumoniae*. Por otra parte, López y Kolter (2010) han observado recientemente que el ácido zaragóxico A, un inhibidor de las escualeno sintetas, impide la formación de biofilmes de *Bacillus subtilis* y *S. aureus*. Se sabe que el ácido zaragóxico A inhibe la formación de balsas lipídicas (*lipid rafts*) que contienen una variedad de proteínas de transporte y señalización, entre ellas la denominada flotillin-1. Se ha demostrado la existencia de homólogos de flotilina-1 en numerosas bacterias (entre ellas *B. subtilis* y *S. aureus* y diversos *Streptococcus*). Curiosamente, mientras que algunos miembros de los SGM, como *S. sanguinis*, codifican proteínas muy similares ($E = 10^{-68}$) a la flotilina-1 de *B. subtilis* (YuaG), se encontraron sólo similitudes muy bajas ($E = 10^{-4}$) con proteínas de neumococo, *S. mitis* y *S. oralis*. En consonancia con estos datos, el ácido zaragóxico (entre 10 y 400 μM) no mostró efecto significativo alguno en la formación del biofilm (datos no mostrados).

4. LOS BIOFILMES DE *S. PNEUMONIAE* ELUDEN EL SISTEMA INMUNE

En las últimas dos décadas, muchos estudios han descrito el hecho de que las bacterias que forman parte de los biofilmes muestran una resistencia notable a los componentes del sistema inmune del hospedador (para revisiones recientes, véase Nobbs *et al.*, 2009; Fey, 2010; Hundstad y Justice, 2010; Benakanakere y Kinane, 2012; Elias y Banin, 2012). Sin embargo, aún no está claro si esta resistencia se asocia exclusivamente con alteraciones fenotípicas de las bacterias que los integran provocadas por el modo de vida sésil o no. Consecuentemente, resulta necesario conseguir una mejor comprensión de los mecanismos mediante los cuales las bacterias que forman el biofilm son capaces de eludir el sistema inmune. Las bacterias poseen una serie de mecanismos para evadir de las defensas del hospedador, como son la cápsula (Morán *et al.*, 1998; Shiau y Wu, 1998; Barbuti *et al.*, 2010; Hyams *et al.*, 2010) o diversas proteínas de superficie y modificaciones en éstas (Kraiczy y Würzner, 2006; Blom *et al.*, 2009; Dalia *et al.*, 2010; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011), pero no está claro cómo estos factores pueden contribuir específicamente en las propiedades de los biofilmes para conferirles resistencia frente al sistema inmune.

Se ha observado que los biofilmes de algunas bacterias como *Mycoplasma pulmonis* (Simmons y Dybvig, 2007), *Porphyromonas gingivalis* (Hajishengallis *et al.*, 2012) y *S. epidermidis* (Kristian *et al.*, 2008) confieren protección frente al sistema inmune del hospedador, gracias a la evasión del sistema del complemento. Así, se ha demostrado que los biofilmes de *S. epidermidis* permiten un menor depósito de C3b e IgG que los cultivos planctónicos (Kristian *et al.*, 2008). Al igual que en estas bacterias, en esta Tesis se ha descrito que cuando *S. pneumoniae* se multiplica en forma de biofilm, es capaz de reducir la respuesta inmune mediada por el sistema del complemento al impedir que C3b, C1q y la proteína de fase aguda CRP se depositen de forma eficiente en la superficie de neumococo (Figs. 52, 55 y 56). Además podemos afirmar que el biofilm neumocócico no constituye una barrera infranqueable para el depósito de estas moléculas del complemento, ya que hemos observado que las moléculas de C3b penetran a través del biofilm, llegando hasta las capas inferiores (Fig. 53). Esto mismo se ha descrito en los biofilmes de *S. epidermidis* (Cerca *et al.*, 2006). Las células del biofilm reclutan eficazmente el fH (Fig. 57) interfiriendo, de este modo, en el normal funcionamiento de la vía alternativa que resulta en la amplificación del depósito de C3b en la superficie bacteriana. Ello

explicaría los menores niveles de C3b observados en la superficie bacteriana de las células del biofilm (Fig. 52). Además, se ha observado que el reclutamiento del fH por parte del biofilm neumocócico es dependiente de la proteína PspC (Fig. 58). PspC, como ya se ha comentado previamente, es una CBP y un factor importante para la colonización y enfermedad invasiva (Zhang *et al.*, 2000; Brock *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2010; Asmat *et al.*, 2011). Esta proteína de superficie es capaz de unir C3b del complemento —lo que impide la opsonización— y el fH humano (Dave *et al.*, 2004; Quin *et al.*, 2005), un factor que inhibe la activación de la vía alternativa. En otros microorganismos como *Treponema denticola*, un patógeno periodontal, se ha observado que la evasión del sistema inmune tiene lugar también mediante la unión de fH a una proteína de superficie (en este caso, la lipoproteína FhbB) (McDowell *et al.*, 2007, 2009, 2010), de manera análoga a lo que ocurre en *S. pneumoniae* entre el fH y PspC. Se ha descrito que la activación de la vía alternativa del complemento representa uno de los mecanismos de defensa del hospedador frente a las infecciones neumocócicas durante el desarrollo de la otitis media aguda (Li *et al.*, 2011). El hecho de que el biofilm de neumococo sea capaz de reclutar el fH de forma eficiente junto con el menor depósito de C3b observado sobre la superficie del biofilm, hace que sea muy importante fomentar la búsqueda de fármacos anti-biofilmes.

La posible repercusión fisiológica de la evasión del complemento por parte de los biofilmes se ha estudiado llevando a cabo ensayos de fagocitosis (Vuong *et al.*, 2004; Kristian *et al.*, 2008) comparando con cultivos planctónicos. Sin embargo, la aplicación de esta técnica para el estudio de biofilmes plantea algunas limitaciones técnicas importantes como es el número de células bacterianas (por lo general alrededor de 10^7 UFC ml^{-1} con el fin de mantener una proporción equilibrada entre las bacterias y los fagocitos). Los biofilmes maduros tienen una densidad celular mucho más alta que los cultivos planctónicos y, por ello, hay recurrir a realizar diluciones de aquellos (Meluleni *et al.*, 1995; Cerca *et al.*, 2006). También hay que tener en cuenta el estado de maduración del biofilm ya que se ha descrito que los biofilmes maduros de *S. aureus* evaden mejor la fagocitosis que los más “jóvenes” (Günther *et al.*, 2009). Otro aspecto discutido es si el biofilm evade mejor el sistema inmunológico debido a la falta de penetrabilidad de los componentes de la respuesta inmune (Costerton *et al.*, 1999). Por estas razones, en esta Tesis, además de utilizar la misma cantidad de bacterias planctónicas que sésiles y de emplear una cepa no capsulada, se ha llevado a cabo la disgregación del biofilm neumocócico para tratar

de evitar posibles interpretaciones erróneas. Se comprobó que, entre un biofilm disgregado y otro intacto, no existen diferencias ni en el depósito de moléculas del complemento ni en los ensayos de fagocitosis.

Los resultados obtenidos con el sistema de complemento mostraron que los biofilmes de la cepa no capsulada de *S. pneumoniae* P040 son capaces de evitar la opsonofagocitosis mediada por neutrófilos polimorfonucleares humanos a diferencia de lo que ocurre en un cultivo planctónico (Fig. 59). En otros biofilmes bacterianos como el de *S. epidermidis*, se ha descrito cómo las bacterias que integran el biofilm evitan la deposición de IgG y C3b produciendo un incremento en la resistencia a la fagocitosis del biofilm comparado con las bacterias planctónicas (Kristian *et al.*, 2008). Estudios llevados a cabo con el componente exopolisacárido del biofilm de *S. epidermidis* (PIA), han evidenciado que éste confiere protección contra la fagocitosis (Vuong *et al.*, 2004; Cerca *et al.*, 2006). Un trabajo más reciente pone de manifiesto que las cepas de *S. epidermidis* productoras de PIA poseen mayor capacidad proinflamatoria al activar el sistema del complemento pero, al tener lugar una disminución en la activación de granulocitos y citoquinas, se dificulta notablemente la erradicación del biofilm (Fredheim *et al.*, 2011). Schommer y cols. (2011) han observado que, además del PIA, los biofilmes de *S. epidermidis* cuentan con dos proteínas, una de superficie (Aap) y otra extracelular (Embp), para evadir eficazmente el sistema inmune del hospedador al conferir protección frente a la fagocitosis. Contra lo que pudiera pensarse, los biofilmes de *P. aeruginosa* aumentan su formación en presencia de neutrófilos ya que los neutrófilos necróticos sirven de matriz biológica para la formación de los biofilmes gracias a la liberación de polímeros de actina y ADN (Walker *et al.*, 2005). Además, se ha comprobado que, el ADN-e es el mayor componente proinflamatorio de la matriz del biofilm de *P. aeruginosa* (Fuxman *et al.*, 2010). Leid y cols. (2002) han descrito que los leucocitos humanos penetran en el biofilm de *S. aureus* pero son incapaces de fagocitar a las bacterias que lo integran. En nuestro caso, el mecanismo por el que los biofilmes de neumococo eluden la fagocitosis por las células profesionales del hospedador parece estar vinculado a una mayor resistencia a la inmunidad mediada por el sistema del complemento. Los factores que intervienen en la formación del biofilm pueden representar dianas prometedoras en la búsqueda de moléculas capaces de prevenir las infecciones asociadas a biofilmes en *S. pneumoniae* ya que la inhibición de la formación del biofilm hace que la bacteria sea más susceptible a la acción del complemento y a la subsiguiente fagocitosis. Todos estos datos indican que las bacterias que integran el bio-

film neumocócico tienen características fenotípicas diferentes a las de las bacterias en estado planctónico. Este trabajo sienta las bases para el comienzo de una nueva línea de investigación a desarrollar en el laboratorio encaminada a conocer más sobre las interacciones patógeno-hospedador durante el crecimiento sésil de las bacterias.

5. NUEVAS ESTRATEGIAS ANTI-BIOFILMES NEUMOCÓCICOS

El creciente y preocupante desarrollo de resistencias antibióticas y los altos costes derivados de la hospitalización de pacientes con infecciones neumocócicas, ha promovido la búsqueda de alternativas a los antibióticos actualmente en uso pero, además, los biofilmes confieren protección y persistencia adicionales a las bacterias que los forman (Costerton *et al.*, 1999). Por esta razón, la investigación de nuevas (y, a veces, no tan nuevas), medidas terapéuticas es una necesidad hoy en día.

El xilitol es capaz de inhibir la formación del biofilm neumocócico a partir de 50 mg ml⁻¹ (Fig. 60), en parte porque este edulcorante habitual de los chicles disminuye el crecimiento bacteriano (Renko *et al.*, 2008). Algunos estudios sugieren que el xilitol puede prevenir la otitis media aguda al haberse observado una inhibición del crecimiento de neumococo y de la adherencia de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* a las células nasofaríngeas (Uhari *et al.*, 2000). Posteriormente, este mismo grupo demostró que el xilitol produce cambios en la ultraestructura de neumococo (por ejemplo, la pared celular aparece difusa al microscopio electrónico) (Tapiainen *et al.*, 2004) y disminuye significativamente la expresión de los genes capsulares de distintos serotipos de neumococo analizados en cultivos planctónicos (Kurola *et al.*, 2009). En *S. mutans* se ha descrito también este mismo efecto del xilitol sobre el metabolismo del polisacárido capsular (Söderling *et al.*, 1987). En nuestros ensayos, se analizó el efecto del xilitol sobre los biofilmes de la cepa no capsulada *S. pneumoniae* R6. Durante la redacción de esta Tesis, nuestros resultados han sido refrendados por los de Kurola y cols. (2011) quienes observaron, además, que la reducción causada por el xilitol en la formación de biofilmes por parte de aislados clínicos de neumococo de diferentes serotipos no tiene lugar en presencia de fuentes adicionales de carbono como la glucosa. Por otra parte, en *S. mutans*, el xilitol, además de producir la inhibición de la glicolisis, reduce la cantidad de polisacáridos adherentes extracelulares y de ácidos lipoteicoicos, lo que conduciría a la formación de unos biofilmes muy débilmente unidos a las superficies dentarias (Mäkinen,

2010). Esto podría explicar por qué este compuesto inhibe el crecimiento y, por tanto, la formación de biofilmes neumocócicos.

A diferencia del xilitol, la NAC además de inhibir la capacidad de formación del biofilm neumocócico (Fig. 61A), es capaz de disgregarlo (Fig. 61B) a concentraciones inferiores a la MIC y que, teóricamente, pueden ser alcanzadas en las secreciones orofaríngeas cuando se emplean las dosis habituales del fármaco en humanos (Riise *et al.*, 2000). Además de disgregar el biofilm, la NAC produce la muerte bacteriana (Fig. 61C). Asimismo, se ha descrito la pérdida de adherencia de cultivos planctónicos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* a células epiteliales de la orofaringe después del tratamiento con distintas concentraciones de NAC *in vitro* (Riise *et al.*, 2000). Otros grupos de investigación han demostrado que la NAC disminuye la formación de biofilmes (Pérez-Giraldo *et al.*, 1997; Marchese *et al.*, 2003; Schwandt *et al.*, 2004) y la producción de los exopolisacáridos de la matriz (Olofsson *et al.*, 2003), además de promover la disgregación de los biofilmes maduros de otras bacterias (Marchese *et al.*, 2003; Schwandt *et al.*, 2004; Aslam *et al.*, 2007; Zhao y Liu, 2010; Leite *et al.*, 2011). La combinación de NAC con antibióticos es una alternativa a la terapia antibiótica habitual. La administración de NAC con amoxicilina, eritromicina y/o levofloxacina apenas mejoró la actividad antibacteriana de ambos compuestos. Sin embargo, la terapia secuencial intramuscular-aerosol con tianfenicol más NAC tuvo un éxito clínico notable (84–100%) en los pacientes con rinosinusitis recurrente y en infecciones en las vías del tracto respiratorio superior en las que se ha demostrado la presencia de biofilmes (de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *H. influenzae*) (Macchi *et al.*, 2006). También se ha descrito una reducción significativa del biofilm de *S. epidermidis* con el tratamiento combinado de NAC y rifampicina (Leite *et al.*, 2011). Usando un modelo en ratas de meningitis bacteriana causada por *S. pneumoniae*, se demostró el efecto beneficioso del tratamiento con la NAC y otros antioxidantes en las lesiones corticales, siendo un prometedor tratamiento adyuvante de la meningitis bacteriana (Auer *et al.*, 2000). Este compuesto se usa en clínica para el tratamiento de la bronquitis crónica, cáncer e intoxicaciones por paracetamol (Olofsson *et al.*, 2003), y, por todas las investigaciones realizadas en los últimos años, la NAC posee propiedades antibacterianas y antibiofilmes que pueden colaborar con o, tal vez, sustituir a fármacos en uso para infecciones provocadas por biofilmes o por bacterias muy resistentes a los antibióticos habituales.

Aunque los antibióticos de última generación y/o la combinación de éstos con otros compuestos como el NAC, estén dando buenos resultados, es importante se-

guir buscando y desarrollando nuevas alternativas o recuperar viejas líneas de investigación en la lucha contra estos patógenos y sus biofilmes.

Una terapia alternativa es, por ejemplo, el uso de la enzima DNasa para el tratamiento de infecciones pleurales combinada con un activador del plasminógeno tisular; este tratamiento mejora el drenaje y reduce la cirugía y la estancia hospitalaria de los pacientes (Rahman *et al.*, 2011). Como ya se ha dicho anteriormente, la matriz del biofilm neumocócico contiene, al igual que otros biofilmes bacterianos, ADN-e y, en consecuencia, niños mayores de 5 años con fibrosis quística pueden ser tratados con DNasa I recombinante humana, para mejorar la función pulmonar cuando se administra como aerosol o nebulizador (Smyth *et al.*, 2010). Este tratamiento podría también ser eficaz en pacientes con infecciones producidas por neumococo (Hall-Stoodley *et al.*, 2008). Otra alternativa es el uso de enzimas bacterianas que degradan el exopolisacárido de la matriz del biofilm como, por ejemplo, la DispB, que disgrega los biofilmes de *Staphylococcus*, *A. pleuropneumoniae* (Izano *et al.*, 2008), *E. coli* (Itoh *et al.*, 2005) y *Bordetella* (Parise *et al.*, 2007), aunque como ya se comentado anteriormente en esta Tesis, no tiene ningún efecto sobre el biofilm neumocócico.

Una nueva estrategia para el control de los biofilmes es el uso de enzimas que degradan la pared celular bacteriana. Las enzimas líticas de pared celular (o mureín-hidrolasas) como la amidasa Pal y la lisozima Cpl-1, codificadas respectivamente por los fagos Dp-1 y Cp-1, permitió a Loeffler y cols. (2001) erradicar el estado portador en la nasofaringe de ratones infectados por neumococo y acuñar el término “enzibióticos” para estas lisinas (Nelson *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que el tratamiento con Cpl-1 elimina la colonización e impide el desarrollo de otitis media (McCullers *et al.*, 2007). En trabajos previos se ha demostrado la capacidad de las endolisinas de los fagos ϕ 11 y SAL-2 para eliminar *in vitro* los biofilmes de *S. aureus* (Sass y Bierbaum, 2007; Son *et al.*, 2010).

En nuestro caso, los resultados obtenidos con las enzimas fágicas Ejl, Pal, Cpl-1 y Cpl-7 y las autolisinas LytA y LytC de neumococo son prometedores para el tratamiento de los biofilmes de neumococo (Figs. 62 y 63). Es notable que la mayoría de estas enzimas, además de tener un efecto bactericida, también disgregan el biofilm neumocócico. Sin embargo, aunque Pal y LytC, no producen un cambio aparente en la estructura del biofilm, sí se ha comprobado que producen la muerte de las bacterias que lo integran (Figs. 62 y 63). Tras el tratamiento de los biofilmes de neumococo con las enzimas Pal o LytC y posterior tinción con CV no se observa

una reducción en la A_{595} respecto al control sin tratamiento. Una posible explicación a este hecho podría ser una mayor adhesión de las bacterias a la superficie del pocillo mediada por la acción de las hidrolasas de pared en *S. epidermidis* (Heilmann *et al.*, 1997) o tras el tratamiento con la endolisina del fago $\phi 12$ en biofilmes de *S. aureus* (Sass y Bierbaum, 2007). En el caso del tratamiento con LytC es posible que las bacterias muertas queden unidas entre sí y al ADN-e de la matriz del biofilm neumocócico, debido a los complejos de esta autolisina con el ADN-e, tal y como se ha descrito en el capítulo 3 de Resultados. En cualquier caso es interesante apuntar que las propiedades exclusivamente bactericidas de LytC y Pal podrían poseer interés terapéutico en determinadas ocasiones como, por ejemplo, en casos de meningitis donde la lisis masiva de las bacterias podría producir una reacción inflamatoria aumentada sumamente perjudicial para el paciente. Habrá que investigar además si la destrucción del biofilm neumocócico causada por las enzimas líticas de pared no podría colaborar en alguna medida a la dispersión de algunas células viables del biofilm.

Además, se ha demostrado que la combinación de diferentes enzimas que degradan la pared bacteriana, como la amidasa LytA y la lisozima Cpl-1 (Fig. 64), es más efectiva para el tratamiento de infecciones neumocócicas asociadas a biofilmes.

Hay que tener en cuenta que estas enzimas poseen indudables ventajas para su posible uso terapéutico: 1) son fáciles de producir en grandes cantidades y de forma pura (Sánchez-Puelles *et al.*, 1992); 2) poseen una estructura modular que puede permitir su manipulación por ingeniería genética y la modificación de su actividad y espectro antibacteriano (López *et al.*, 2000); 3) no se han descrito resistencias a las endolisinas bacterianas, y 4) los anticuerpos producidos no bloquean su actividad (Fischetti *et al.*, 2010). Por otra parte, es interesante resaltar que la vida media de los enzibióticos en plasma no es muy diferente de la de varios antibióticos β -lactámicos de uso común e incluso más larga que la de la cefotaxima (Soriano *et al.*, 1996). En cualquier caso, recientes experimentos demuestran que es posible manipular alguna de estas proteínas para incrementar su actividad y alargar su permanencia en plasma (Resch *et al.*, 2011).

En resumen, la utilización de compuestos como el xilitol o la NAC y la combinación de hidrolasas de pared de *S. pneumoniae* y endolisinas fágicas, constituyen alternativas muy prometedoras para la prevención y tratamiento de las infecciones neumocócicas asociadas a biofilmes neumocócicos.

VI. CONCLUSIONES

1. La formación del biofilm es un proceso multifactorial en el que intervienen genes implicados en muy diversas funciones celulares.
2. Además de genes del metabolismo de carbohidratos y síntesis de poliaminas, se describe por primera vez la implicación de la proteína PhtE (candidata para una nueva vacuna proteica) en el desarrollo de un biofilm neumocócico.
3. La metalopeptidasa de membrana Spr0607 parece estar implicada en la formación del biofilm. Esta enzima parece catalizar la hidrólisis de una o más proteínas de la matriz del biofilm controlando así la cantidad de proteínas extracelulares necesarias para la formación y mantenimiento del biofilm.
4. Las cepas tolerantes a vancomicina forman un menor biofilm. La deficiencia de LytA, el fondo genético y la expresión/regulación del sistema CiaRH pueden explicar la menor formación de biofilm de estas cepas.
5. Los biofilmes del serotipo 3 presentan una notable heterogeneidad debida a la coexistencia de bacterias capsuladas y mutantes no capsulados. Estos últimos podrían desempeñar un papel esencial en las etapas iniciales del desarrollo del biofilm.
6. En general, el polisacárido capsular puede constituir una barrera física que impide o, al menos, dificulta, las primeras etapas de formación del biofilm. No obstante, la estructura química del polisacárido capsular influye en la formación del biofilm ya que, dentro del mismo serogrupo capsular, se ha observado que los neumococos de los serotipos 19A y 19F son buenos formadores de biofilm mientras que los de serotipos 19B y 19C no.
7. La matriz del biofilm neumocócico contiene ADN-e mientras que el ARN es un componente minoritario.
8. Las proteínas de la matriz extracelular son importantes tanto para la formación como para el mantenimiento del biofilm y su abundancia parece estar bajo el control de una o más serín-proteasas.
9. Es muy probable la existencia de complejos ADN-proteína y, más concretamente, con LytC, en la matriz del biofilm de neumococo.
10. En dicha matriz se ha demostrado la existencia de uno o más polisacáridos que contienen residuos de Glc $\beta(1\rightarrow4)$ y GlcNAc $\beta(1\rightarrow4)$ junto con, posiblemente,

CONCLUSIONES

residuos de Galp. Además, parece probable que el polisacárido (o polisacáridos) contengan ramificaciones de Glc o Gal $\alpha(1\rightarrow6)$.

11. LytB podría desempeñar un papel esencial en las etapas iniciales de la formación del biofilm, ayudando a la diseminación de las células hijas sobre la superficie a colonizar.
12. Las bacterias que forman el biofilm de *S. pneumoniae* permiten un depósito de C3b en su superficie menor que las de los cultivos planctónicos.
13. El biofilm elude la vía clásica del sistema del complemento reduciendo la deposición de C1q y CRP.
14. Junto con lo anterior, el biofilm neumocócico se evade de la vía alternativa del sistema del complemento al reclutar de forma más eficaz que un cultivo planctónico, el factor H, un regulador negativo de esta vía.
15. La evasión del sistema del complemento tiene como consecuencia fisiológica una menor opsonofagocitosis de las bacterias que forman parte del biofilm.
16. Compuestos como el xilitol y la NAC pueden utilizarse para prevenir la formación de biofilmes neumocócicos. Además, la NAC ha mostrado una potencial acción terapéutica.
17. Las hidrolasas de pared de neumococo LytA y LytC, las endolisinas fágicas Pal, Ejl, Cpl-1 y Cpl-7 y combinaciones de las mismas, como LytA + Cpl-1, constituyen una prometedora alternativa para el tratamiento de las infecciones neumocócicas asociadas a biofilmes.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aanensen, D.M. y Spratt, B.G. (2005) The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res* **33**: W728–W733.
- Aanensen, D.M., Mavroidi, A., Bentley, S.D., Reeves, P.R. y Spratt, B.G. (2007) Predicted functions and linkage specificities of the products of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J Bacteriol* **189**: 7856–7876.
- Abbott, D.W., Higgins, M.A., Hyrnuik, S., Pluvinage, B., Lammerts van Bueren, A. y Boraston, A.B. (2010) The molecular basis of glycogen breakdown and transport in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **77**: 183–199.
- Adams, G.A. (1965) Complete acid hydrolysis. *Methods Carbohydr Chem* **5**: 269–276.
- Adamou, J.E., Wizemann, T.M., Barren, P. y Langermann, S. (1998) Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infect Immun* **66**: 820–822.
- Adamou, J.E., Heinrichs, J.H., Erwin, A.L., Walsh, W., Gayle, T., Dormitzer, M. *et al.* (2001) Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins (the Pht family) that are protective against sepsis. *Infect Immun* **69**: 949–958.
- Agarwal, V., Asmat, T.M., Dierdorf, N.I., Hauck, C.R. y Hammerschmidt, S. (2010) Polymeric immunoglobulin receptor-mediated invasion of *Streptococcus pneumoniae* into host cells requires a coordinate signaling of SRC family of protein-tyrosine kinases, ERK, and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **285**: 35615–35623.
- Agrawal, A., Suresh, M.V., Singh, S.K. y Ferguson, D.A., Jr. (2008) The protective function of human C-reactive protein in mouse models of *Streptococcus pneumoniae* infection. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **8**: 231–237.
- Aguiar, S., Serrano, I., Pinto, F., Melo-Cristino, J. y Ramirez, M. (2008) The presence of the pilus locus is a clonal property among pneumococcal invasive isolates. *BMC Microbiol* **8**: 41.
- Ahn, S.-J., Lemos, J.A.C. y Burne, R.A. (2005) Role of HtrA in growth and competence of *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol* **187**: 3028–3038.
- Akerley, B.J., Rubin, E.J., Camilli, A., Lampe, D.J., Robertson, H.M. y Mekalanos, J.J. (1998) Systematic identification of essential genes by *in vitro* mariner mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8927–8932.
- Alberts, B. (2009) Essential cell biology. Garland Science, New York, NY.
- Alcantara, R.B., Preheim, L.C. y Gentry-Nielsen, M.J. (2001) Pneumolysin-induced complement depletion during experimental pneumococcal bacteremia. *Infect Immun* **69**: 3569–3575.
- Allegrucci, M. y Sauer, K. (2007) Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* **189**: 2030–2038.
- Allegrucci, M. y Sauer, K. (2008) Formation of *Streptococcus pneumoniae* non-phase-variable colony variants is due to increased mutation frequency present under biofilm growth conditions. *J Bacteriol* **190**: 6330–6339.
- Allegrucci, M., Hu, F.Z., Shen, K., Hayes, J., Ehrlich, G.D., Post, J.C. y Sauer, K. (2006) Phenotypic characterization of *Streptococcus pneumoniae* biofilm development. *J Bacteriol* **188**: 2325–2335.
- Allesen-Holm, M., Barken, K.B., Yang, L., Klausen, M., Webb, J.S., Kjelleberg, S. *et al.* (2006) A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* **59**: 1114–1128.
- Altabe, S., López, P. y de Mendoza, D. (2007) Isolation and characterization of unsaturated fatty acid auxotrophs of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* **189**: 8139–8144.
- Anderson, G.G. y O'Toole, G.A. (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunology* **322**: 85–105.
- Anderton, J.M., Rajam, G., Romero-Steiner, S., Summer, S., Kowalczyk, A.P., Carlone, G.M. *et al.* (2007) E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **42**: 225–236.

BIBLIOGRAFÍA

- Antón, N., Blázquez, R., Gómez-Garcés, J.L. y Alós, J.I. (2001) Study of vancomycin tolerance in 120 strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated in 1999 in Madrid, Spain. *J Antimicrob Chemother* **47**: 902–903.
- Arbique, J.C., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Quesne, G., Carvalho, M.d.G.S., Steigerwalt, A.G. *et al.* (2004) Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol* **42**: 4686–4696.
- Arrecubieta, C., López, R. y García, E. (1994) Molecular characterization of *cap3A*, a gene from the operon required for the synthesis of the capsule of *Streptococcus pneumoniae* type 3: sequencing of mutations responsible for the unencapsulated phenotype and localization of the capsular cluster on the pneumococcal chromosome. *J Bacteriol* **176**: 6375–6383.
- Arrecubieta, C., García, E. y López, R. (1995) Sequence and transcriptional analysis of a DNA region involved in the production of capsular polysaccharide in *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Gene* **167**: 1–7.
- Arrecubieta, C., García, E. y López, R. (1996a) Demonstration of UDP-glucose dehydrogenase activity in cell extracts of *Escherichia coli* expressing the pneumococcal *cap3A* gene required for the synthesis of type 3 capsular polysaccharide. *J Bacteriol* **178**: 2971–2974.
- Arrecubieta, C., López, R. y García, E. (1996b) Type 3-specific synthase of *Streptococcus pneumoniae* (Cap3B) directs type 3 polysaccharide biosynthesis in *Escherichia coli* and in pneumococcal strains of different serotypes. *J Exp Med* **184**: 449–455.
- Aslam, S., Trautner, B.W., Ramanathan, V. y Darouiche, R.O. (2007) Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 1556–1558.
- Asmat, T.M., Agarwal, V., Ráth, S., Hildebrandt, J.-P. y Hammerschmidt, S. (2011) *Streptococcus pneumoniae* infection of host epithelial cells via polymeric immunoglobulin receptor transiently induces calcium release from intracellular stores. *J Biol Chem* **286**: 17861–17869.
- Attali, C., Durmort, C., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2008) The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect Immun* **76**: 5350–5356.
- Auer, M., Pflister, L.-A., Leppert, D., Täuber, M.G. y Leib, S.L. (2000) Effects of clinically used antioxidants in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis* **182**: 347–350.
- Ausmees, N., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. y Lindberg, M. (2001) Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 163–167.
- Austrian, R. (1981) Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev Infect Dis* **3**: 183–189.
- Austrian, R. (1986) Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother* **18 (Suppl. A)**: 35–45.
- Austrian, R. (1993) The pneumococcus and some men who came to Yale: the Dorothy M. Horstmann Lecture. *Yale J Biol Med* **66**: 315–324.
- Austrian, R. (2000) The enduring pneumococcus: unfinished business and opportunities for the future. En: *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanisms of Disease. A. Tomasz (ed). Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, pp. 3–7.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M. y McCarty, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J Exp Med* **79**: 137–158.
- Azeredo, J. y Sutherland, I.W. (2008) The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* **9**: 261–266.

- Bagnoli, F., Moschioni, M., Donati, C., Dimitrovska, V., Ferlenghi, I., Facciotti, C. *et al.* (2008) A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J Bacteriol* **190**: 5480–5492.
- Ballicora, M.A., Iglesias, A.A. y Preiss, J. (2003) ADP-glucose pyrophosphorylase, a regulatory enzyme for bacterial glycogen synthesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 213–225.
- Balsalobre, L., Ferrándiz, M.J., Liñares, J., Tubau, F. y de la Campa, A.G. (2003) Viridans group streptococci are donors in horizontal transfer of topoisomerase IV genes to *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2072–2081.
- Balsalobre, L., Hernández-Madrid, A., Llull, D., Martín-Galiano, A.J., García, E., Fenoll, A. y de la Campa, A.G. (2006) Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J Clin Microbiol* **44**: 4163–4171.
- Banerjee, A., van Sorge, N.M., Sheen, T.R., Uchiyama, S., Mitchell, T.J. y Doran, K.S. (2010) Activation of brain endothelium by pneumococcal neuraminidase NanA promotes bacterial internalization. *Cell Microbiol* **12**: 1576–1588.
- Barbuti, G., Moschioni, M., Fumarulo, R., Censini, S. y Montemurro, P. (2010) *Streptococcus pneumoniae* modulates the respiratory burst response in human neutrophils. *FEMS Immunol Med Microbiol* **60**: 57–62.
- Barnard, J.P. y Stinson, M.W. (1996) The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect Immun* **64**: 3853–3857.
- Barocchi, M.A., Ries, J., Zogaj, X., Hemsley, C., Albiger, B., Kanth, A. *et al.* (2006) A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2857–2862.
- Beghetto, E., Gargano, N., Ricci, S., Garufi, G., Peppoloni, S., Montagnani, F. *et al.* (2006) Discovery of novel *Streptococcus pneumoniae* antigens by screening a whole-genome I-display library. *FEMS Microbiol Lett* **262**: 14–21.
- Benakanakere, M. y Kinane, D.F. (2012) Innate cellular responses to the periodontal biofilm. *Front Oral Biol* **15**: 41–55.
- Benson, C.E. y Sweeney, C.R. (1984) Isolation of *Streptococcus pneumoniae* type 3 from equine species. *J Clin Microbiol* **20**: 1028–1030.
- Bentley, S.D., Aanensen, D., Mavroidi, A., Saunders, D., Rabinowitsch, E., Collins, M. *et al.* (2006) Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. *PLoS Genet* **2**: e31.
- Bergeron, Y., Ouellet, N., Deslauriers, A.-M., Simard, M., Olivier, M. y Bergeron, M.G. (1998) Cytokine kinetics and other host factors in response to pneumococcal pulmonary infection in mice. *Infect Immun* **66**: 912–922.
- Bergmann, S. y Hammerschmidt, S. (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* **152**: 295–303.
- Bergmann, S., Lang, A., Rohde, M., Agarwal, V., Rennemeier, C., Grashoff, C. *et al.* (2009) Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J Cell Sci* **122**: 256–267.
- Bernheimer, H.P. y Wermundsen, I.E. (1972) Homology in capsular transformation reactions in *Pneumococcus*. *Mol Gen Genet* **116**: 68–83.
- Berrón, S., Fenoll, A., Ortega, M., Arellano, N. y Casal, J. (2005) Analysis of the genetic structure of non-typeable pneumococcal strains isolated from conjunctiva. *J Clin Microbiol* **43**: 1694–1698.
- Berry, A.M., Lock, R.A. y Paton, J.C. (1996) Cloning and characterization of *nanB*, a second *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase gene, and purification of the NanB enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 4854–4860.

BIBLIOGRAFÍA

- Bijlsma, J.J.E., Burghout, P., Kloosterman, T.G., Bootsma, H.J., de Jong, A., Hermans, P.W.M. y Kuipers, O.P. (2007) Development of genomic array footprinting for identification of conditionally essential genes in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1514–1524.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–1523.
- Bishop, C.J., Aanensen, D.M., Jordan, G.E., Kilian, M., Hanage, W.P. y Spratt, B.G. (2009) Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biol* **7**: 3.
- Biswas, S. y Biswas, I. (2005) Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **73**: 6923–6934.
- Blom, A.M., Villoutreix, B.O. y Dahlbäck, B. (2003) Mutations in α -chain of C4BP that selectively affect its factor I cofactor function. *J Biol Chem* **278**: 43437–43442.
- Blom, A.M., Hallström, T. y Riesbeck, K. (2009) Complement evasion strategies of pathogens—Acquisition of inhibitors and beyond. *Mol Immunol* **46**: 2808–2817.
- Blomberg, C., Dagerhamn, J., Dahlberg, S., Browall, S., Fernebro, J., Albiger, B. *et al.* (2009) Pattern of accessory regions and invasive disease potential in *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **199**: 1032–1042.
- Blumenkrantz, N. y Asboe-Hansen, G. (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal Biochem* **54**: 484–489.
- Bogaert, D., Thompson, C.M., Trzcinski, K., Malley, R. y Lipsitch, M. (2010) The role of complement in innate and adaptive immunity to pneumococcal colonization and sepsis in a murine model. *Vaccine* **28**: 681–685.
- Bolken, T.C., Franke, C.A., Zeller, G.O. y Hruby, D.E. (2001) Identification of an intragenic integration site for foreign gene expression in recombinant *Streptococcus gordonii* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **55**: 192–197.
- Bonafonte, M. A., Solano, C., Sesma, B., Alvarez, M., Montuenga, L., García-Ros, D. y Gamazo, C. 2000. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*. *FEMS Microbiol. Lett* **191**: 31–36.
- Bonofiglio, L., García, E. y Mollerach, M. (2005) Biochemical characterization of pneumococcal glucose 1-phosphate uridylyltransferase (GalU) essential for capsule biosynthesis. *Curr Microbiol* **51**: 217–221.
- Boost, M.V., Ko, W.M. y O'Donoghue, M.M. (2003) Penicillin and vancomycin tolerance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hong Kong. *Hong Kong Med J* **9**: 415–418.
- Bove, P., Capozzi, V., Garofalo, C., Rieu, A., Spano, G. y Fiocco, D. (2011) Inactivation of the *ftsH* gene of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: effects on growth, stress tolerance, cell surface properties and biofilm formation. *Microbiol Res* doi:10.1016/j.micres.2011.07.001.
- Boyd, A. y Chakrabarty, A.M. (1994) Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2355–2359.
- Branda, S.S., Vik, Å., Friedman, L. y Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**: 20–26.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.
- Brandl, M.T., Carter, M.Q., Parker, C.T., Chapman, M.R., Huynh, S. y Zhou, Y. (2011) *Salmonella* biofilm formation on *Aspergillus niger* involves cellulose – chitin interactions. *PLoS One* **6**: e25553.
- Bratcher, P.E., Park, I.H., Hollingshead, S.K. y Nahm, M.H. (2009) Production of a unique pneumococcal capsule serotype belonging to serogroup 6. *Microbiology* **155**: 576–583.
- Bratcher, P.E., Kim, K.-H., Kang, J.H., Hong, J.Y. y Nahm, M.H. (2010) Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiology* **156**: 555–560.

- Brent, R. y Ptashne, M. (1981) Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**: 4204–4208.
- Brock, S.C., McGraw, P.A., Wright, P.F. y Crowe, J.E., Jr. (2002) The human polymeric immunoglobulin receptor facilitates invasion of epithelial cells by *Streptococcus pneumoniae* in a strain-specific and cell type-specific manner. *Infect Immun* **70**: 5091–5095.
- Brouwer, M.C., de Gans, J., Heckenberg, S.G.B., Zwinderman, A.H., van der Poll, T. y van de Beek, D. (2009) Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* **9**: 31–44.
- Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R. *et al.* (2002) The classical pathway is the dominant complement pathway required for innate immunity to *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16969–16974.
- Brundish, D.E. y Baddiley, J. (1968) Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem J* **110**: 573–582.
- Bryers, J.D. (2008) Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng* **100**: 1–18.
- Brzin, B. (1969) Reversion of α - into β -hemolysis of *Diplococcus pneumoniae* by low concentration of optochin. *Experientia* **25**: 985–986.
- Budhani, R.K. y Struthers, J.K. (1997) The use of Sorbarod biofilms to study the antimicrobial susceptibility of a strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **40**: 601–602.
- Burgos, J., Lujan, M., Falcó, V., Sánchez, A., Puig, M., Borrego, A. *et al.* (2011) The spectrum of pneumococcal empyema in adults in the early 21st century. *Clin Infect Dis* **53**: 254–261.
- Burnaugh, A.M., Frantz, L.J. y King, S.J. (2008) Growth of *Streptococcus pneumoniae* on human glycoconjugates is dependent upon the sequential activity of bacterial exoglycosidases. *J Bacteriol* **190**: 221–230.
- Bustamante, N., Campillo, N.E., García, E., Gallego, C., Pera, B., Diakun, G.P. *et al.* (2010) Cpl-7, a lysozyme encoded by a pneumococcal bacteriophage with a novel cell wall-binding motif. *J Biol Chem* **285**: 33184–33196.
- Calbo, E. y Garau, J. (2010) Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* **35**: 107–113.
- Calbo, E. y Garau, J. (2011) Factors affecting the development of systemic inflammatory response syndrome in pneumococcal infections. *Curr Opin Infect Dis* **24**: 241–247.
- Calix, J.J. y Nahm, M.H. (2010) A new pneumococcal serotype, 11E, has a variably inactivated *wcjE* gene. *J Infect Dis* **202**: 29–38.
- Cámara, M., Boulnois, G.J., Andrew, P.W. y Mitchell, T.J. (1994) A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* **62**: 3688–3695.
- Camilli, R., Pantosti, A. y Baldassarri, L. (2011) Contribution of serotype and genetic background to biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**: 97–102.
- Campbell, R.E., Mosiman, S.C., van de Rijn, I., Tanner, M.E. y Strynadka, N.C. (2000) The first structure of UDP-glucose dehydrogenase reveals the catalytic residues necessary for the two-fold oxidation. *Biochemistry* **39**: 7012–7023.
- Campuzano, S., Serra, B., Llull, D., García, J.L. y García, P. (2009) Cloning, expression, and characterization of a peculiar choline-binding β -galactosidase from *Streptococcus mitis*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5972–5980.
- Cantarel, B.L., Coutinho, P.M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V. y Henrissat, B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Res* **37**: D233–D238.
- Cargill, J.S. y Upton, M. (2009) Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *J Clin Pathol* **62**: 112–1116.

BIBLIOGRAFÍA

- Carrolo, M., Frias, M.J., Pinto, F.R., Melo-Cristino, J. y Ramirez, M. (2010) Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* **5**: e15678.
- Casal, J. (1982) Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*: serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* **22**: 222–225.
- Cathcart, G.R.A., Quinn, D., Greer, B., Harriott, P., Lynas, J.F., Gilmore, B.F. y Walker, N. (2011) Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonal infection. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 2670–2678.
- Cerca, N., Jefferson, K.K., Oliveira, R., Pier, G.B. y Azeredo, J. (2006) Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a biofilm or in the planktonic state. *Infect Immun* **74**: 4849–4855.
- Chandra, G., Chater, K.F. y Bornemann, S. (2011) Un expected and widespread connections between bacterial glycogen and trehalose metabolism. *Microbiology* **157**: 1565–1572.
- Chanter, N. (1994) *Streptococcus pneumoniae* and equine disease. *Equine Vet J* **26**: 5–6.
- Chester, F.D. (1901) A manual of determinative bacteriology. The MacMillan Co., New York.
- Chhatwal, G.S., Preissner, K.T., Müller-Berghaus, G. y Blobel, H. (1987) Specific binding of the human S protein (vitronectin) to streptococci, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**: 1878–1883.
- Chi, F., Leider, M., Leendertz, F., Bergmann, C., Boesch, C., Schenk, S. et al. (2007) New *Streptococcus pneumoniae* clones in deceased wild chimpanzees. *J Bacteriol* **189**: 6085–6088.
- Clarke, V.A., Platt, N. y Butters, T.D. (1995) Cloning and expression of the β -N-acetylglucosaminidase gene from *Streptococcus pneumoniae*. Generation of truncated enzymes with modified aglycon specificity. *J Biol Chem* **270**: 8805–8814.
- Claverys, J.-P. y Håvarstein, L.S. (2007) Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat Rev Microbiol* **5**: 219–229.
- Cohen, R., Levy, C., Bonnet, E., Thollot, F., Boucherat, M., Fritzell, B. et al. (2010) Risk factors for serotype 19A carriage after introduction of 7-valent pneumococcal vaccination. *BMC Infect Dis* **11**: 95.
- Coates, H., Thornton, R., Langlands, J., Filion, P., Keil, A.D., Vijayasekaran, S. y Richmond, P. (2008) The role of chronic infection in children with otitis media with effusion: evidence for intracellular persistence of bacteria. *Otolaryngol Head Neck Surg* **138**: 778–781.
- Coonrod, J.D., Varble, R. y Yoneda, K. (1991) Mechanism of killing of pneumococci by lysozyme. *J Infect Dis* **164**: 527–532.
- Corbin, B.D., McLean, R.J.C. y Aron, G.M. (2001) Bacteriophage T4 multiplication in a glucose-limited *Escherichia coli* biofilm. *Can J Microbiol* **47**: 680–684.
- Corso, A., Severina, E.P., Petruk, V.F., Mauriz, Y.R. y Tomasz, A. (1998) Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. *Microb Drug Resist* **4**: 325–337.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. y Lappin-Scott, H.M. (1995) Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* **49**: 711–745.
- Costerton, J.W., Steward, P.S. y Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318–1322.
- Crisóstomo, M.I., Vollmer, W., Kharat, A.S., Inhülsen, S., Gehre, F., Buckenmaier, S. y Tomasz, A. (2006) Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **61**: 1497–1509.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idänpään-Heikkilä, I. y Tuomanen, E.I. (1995) *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377**: 435–438.

- Curtin, J.J. y Donlan, R.M. (2006) Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1258–1275.
- Dalia, A.B., Standish, A.J. y Weiser, J.N. (2010) Three surface exoglycosidases from *Streptococcus pneumoniae*, NanA, BgaA, and StrH, promote resistance to opsonophagocytic killing by human neutrophils. *Infect Immun* **78**: 2108–2116.
- Danhauer, J.L., Johnson, C.E., Corbin, N.E. y Bruccheri, K.G. (2010) Xylitol as a prophylaxis for acute otitis media: systematic review. *Int J Audiol* **49**: 754–761.
- da Silva, A.J., de Baptista-Neto, A., Cilento, M.d.C., de Campos Giordano, R. y Zangirolami, T.C. (2008) Bioreactor aeration conditions modulate growth and antigen expression during *Erysipelothrix rhusiopathiae* cultivation. *Appl Microbiol Biotechnol* **79**: 23–31.
- Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M.K. y McDaniel, L.S. (2001) PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* **69**: 3435–3437.
- Dave, S., Carmicle, S., Hammerschmidt, S., Pangburn, M.K. y McDaniel, L.S. (2004) Dual roles of PspC, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, in binding human secretory IgA and factor H. *J Immunol* **173**: 471–477.
- Davey, M.E. y Duncan, M.J. (2006) Enhanced biofilm formation and loss of capsule synthesis: deletion of a putative glycosyltransferase in *Porphyrromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **188**: 5510–5523.
- Davies D.G. y Marques, C.N.H. (2009) A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J Bacteriol* **191**: 1393–1403.
- Davis, K.M., Akinbi, H.T., Standish, A.J. y Weiser, J.N. (2008) Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* **4**: e1000241.
- Dawid, S., Sebert, M.E. y Weiser, J.N. (2009) Bacteriocin activity of *Streptococcus pneumoniae* is controlled by the serine protease HtrA via posttranscriptional regulation. *J Bacteriol* **191**: 1509–1518.
- Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F. *et al.* (2007) Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 18490–18495.
- Decousser, J.-W., Ovetchkine, P., Collignon, A., Chaplain, C., Estrangin, E., Fremaux, A. *et al.* (2004a) Multicentre study of the molecular epidemiology, serotypes and antimicrobial susceptibility patterns of invasive *Streptococcus pneumoniae* invasive isolated from children in the Ile de France area. *Eur J Clin Microb Infect Dis* **23**: 27–33.
- Decousser, J.-W., Pina, P., Viguier, F., Picot, F., Courvalin, P. y Allouch, P. (2004b) Invasive *Streptococcus pneumoniae* in France: antimicrobial resistance, serotype, and molecular epidemiology findings from a monthly national study in 2000 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 3636–3639.
- Dejana, E., Orsenigo, F. y Lampugnani, M.G. (2008) The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* **121**: 2115–2122.
- de Jong, A., van Hijum, S.A.F.T., Bijlsma, J.J.E., Kok, J. y Kuipers, O.P. (2006) BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Res* **34**: W273–W279.
- de la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A. y Muñoz, R. (1997) Molecular bases of three characteristic phenotypes of pneumococcus: optochin-sensitivity, coumarin-sensitivity, and quinolone-resistance. *Microb Drug Resist* **3**: 177–193.
- de las Rivas, B., García, J.L., López, R. y García, P. (2001) Molecular characterization of the pneumococcal teichoic acid phosphorylcholine esterase. *Microb Drug Resist* **7**: 213–222.
- De las Rivas, B., García, J.L., López, R. y García, P. (2002) Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative endo- β -N-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol* **184**: 4988–5000.

BIBLIOGRAFÍA

- del Prado, G., Ruiz, V., Naves, P., Rodríguez-Cerrato, V., Soriano, F. y Ponte, M.C. (2010) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains and effects of human serum albumin, ibuprofen, *N*-acetyl-L-cysteine, amoxicillin, erythromycin, and levofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis* **67**: 311–318.
- Demarest, S.J., Salbato, J., Elia, M., Zhong, J., Morrow, T., Holland, T. *et al.* (2005) Structural characterization of the cell wall binding domains of *Clostridium difficile* toxins A and B; evidence that Ca²⁺ plays a role in toxin A cell surface association *J Mol Biol* **346**: 1197–1206.
- Denapaite, D., Brückner, R., Nuhn, M., Reichmann, P., Henrich, B., Maurer, P. *et al.* (2010) The genome of *Streptococcus mitis* B6 – What is a commensal? *PLoS One* **5**: e9426.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I. y Hébraud, M. (2006) Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiology Letters* **256**: 1–15.
- Díaz, E. y García, J.L. (1990) Construction of a broad-host-range pneumococcal promoter-probe plasmid. *Gene* **90**: 163–167.
- Díaz, E., López, R. y García, J.L. (1991) Chimeric pneumococcal cell wall lytic enzymes reveal important physiological and evolutionary traits. *J Biol Chem* **266**: 5464–5471.
- Díaz, E., López, R. y García, J.L. (1992) EJ-1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus pneumoniae* with a *Myoviridae* morphotype. *J Bacteriol* **174**: 5516–5525.
- Dickschat, J.S. (2010) Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep* **27**: 343–369.
- Dieudonné-Vatran, A., Krentz, S., Blom, A.M., Meri, S., Henriques-Normark, B., Riesbeck, K. y Albiger, B. (2009) Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* bind the complement inhibitor C4b-binding protein in a PspC allele-dependent fashion. *J Immunol* **182**: 7865–7877.
- Dillard, J.P. y Yother, J. (1991) Analysis of *Streptococcus pneumoniae* sequences cloned into *Escherichia coli*: effect of promoter strength and transcription terminators. *J Bacteriol* **173**: 5105–5109.
- Dinadayala, P., Lemassu, A., Granovski, P., Cérantola, S., Winter, N. y Daffé, M. (2004) Revisiting the structure of the anti-neoplastic glucans of *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin. Structural analysis of the extracellular and boiling water extract-derived glucans of the vaccine substrains. *J Biol Chem* **279**: 12369–12378.
- Dinadayala, P., Sambou, T., Daffé, M. y Lemassu, A. (2008) Comparative structural analyses of the α-glucan and glycogen from *Mycobacterium bovis*. *Glycobiology* **18**: 502–508.
- Djurkovic, S., Loeffler, J.M. y Fischetti, V.A. (2005) Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 1225–1228.
- Domenech, M., García, E. y Moscoso, M. (2011) Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Biotechnol* doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00294.x.
- Dominiak, D.M., Nielsen, J.L. y Nielsen, P.H. (2011) Extracellular DNA is abundant and important for microcolony strength in mixed microbial biofilms. *Environ Microbiol* **13**: 710–721.
- Donati, C., Hiller, N.L., Tettelin, H., Muzzi, A., Croucher, N., Angiuoli, S. *et al.* (2010) Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. *Genome Biol* **11**: R107.
- Donlan, R.M., Piede, J.A., Heyes, C.D., Sanii, L., Murga, R., Edmonds, P. *et al.* (2004) Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4980–4988.
- Doolittle, M.M., Cooney, J.J. y Caldwell, D.E. (1995) Lytic infection of *Escherichia coli* biofilms by bacteriophage T4. *Can J Microbiol* **41**: 12–18.
- Dopazo, J., Mendoza, A., Herrero, J., Caldara, F., Humbert, Y., Friedli, L. *et al.* (2001) Annotated draft genomic sequence from a *Streptococcus pneumoniae* type 19F clinical isolate. *Microb Drug Resist* **7**: 99–125.

- Downie, A.W. (1972) Pneumococcal transformation — A backward view. Fourth Griffith Memorial Lecture. *J Gen Microbiol* **73**: 1–11.
- Ehrnthaller, C., Ignatius, A., Gebhard, F. y Huber-Lang, M. (2011) New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system. *Mol Med* **17**: 317–329.
- Ekanayake, D.K., West, A.H. y Cook, P.F. (2011) Contribution of K99 and D319 to substrate binding and catalysis in the saccharopine dehydrogenase reaction. *Arch Biochem Biophys* **514**: 8–15.
- Eklund, C., M. (2009) Proinflammatory cytokines in CRP baseline regulation. *Adv Clin Chem* **48**: 111–136.
- El-Azizi, M., Rao, S., Kanchanapoom, T. y Khardori, N. (2005) In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **4**: 2.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H.S. y Håvarstein, L.S. (2009) Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology* **155**: 2223–2234.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Straume, D., Ohnstad, H.S., Berg, K.H., Hermoso, J.A. y Håvarstein, L.S. (2010) Pneumococcal CbpD is a murein hydrolase that requires a dual cell envelope binding specificity to kill target cells during fratricide. *Mol Microbiol* **76**: 905–917.
- Elias, S. y Banin, E. (2012) Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev* doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x.
- Eliopoulos, G. y Moellering, R.C., Jr. (1996) Antimicrobial combinations. En: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. V. Lorian (ed). Baltimore: The Williams & Wilkins Co., pp. 330–396.
- Endo, Y., Matsushita, M. y Fujita, T. (2011) The role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int J Biochem Cell Biol* **43**: 705–712.
- Enright, M.C. y Spratt, B.G. (1998) A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* **144**: 3049–3060.
- Enright, M.C. y Spratt, B.G. (1999) Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* **7**: 482–487.
- Eriksen, K.R. (1945) Studies on induced resistance to penicillin in a pneumococcus type I. *Acta Pathol Microbiol Scand* **23**: 398–401.
- Esposito, A.L., Clark, C.A. y Poirier, W.J. (1990) An assessment of the factors contributing to the killing of type 3 *Streptococcus pneumoniae* by human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *APMIS* **98**: 111–121.
- Exley, R. M., Shaw, J., Mowe, E., Sun, Y-h., West, N. P., Williamson, M. *et al.* (2005) Available carbon source influences the resistance of *neisseria meningitidis* against complement. *J Exp Med* **201**: 1637–1645.
- Falgarone, G. y Chiochia, G. (2009) Clusterin: a multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity. *Adv Cancer Res* **104**: 139–170.
- Fasching, C.E., Grossman, T., Corthésy, B., Plaut, A.G., Weiser, J.N. y Janoff, E.N. (2007) Impact of the molecular form of immunoglobulin A on functional activity in defense against *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **75**: 1801–1810.
- Feldman, C., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., Read, R.C., Todd, H.C. *et al.* (1990) The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium *in vivo*. *Microb Pathog* **9**: 275–284.
- Feldman, C., Anderson, R., Cockeran, R., Mitchell, T., Cole, P. y Wilson, R. (2002) The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium *in vitro*. *Respir Med* **96**: 580–585.
- Felse, P.A. y Panda, T. (1999) Regulation and cloning of microbial chitinase genes. *Appl Microbiol Biotechnol* **51**: 141–151.

BIBLIOGRAFÍA

- Fenoll, A., Muñoz, R., García, E. y de la Campa, A.G. (1994) Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F0 complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H⁺-ATPases. *Mol Microbiol* **12**: 587–598.
- Fernández-Tornero, C., García, E., López, R., Giménez-Gallego, G. y Romero, A. (2002) Two new crystal forms of the choline-binding domain of the major pneumococcal autolysin: insights into the dynamics of the active homodimer. *J Mol Biol* **321**: 163–173.
- Fernández-Tornero, C., López, R., García, E., Giménez-Gallego, G. y Romero, A. (2001) A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA. *Nat Struct Biol* **8**: 1020–1024.
- Fey, P.D. (2010) Modality of bacterial growth presents unique targets: how do we treat biofilm-mediated infections? *Curr Opin Microbiol* **13**: 610–615.
- Finn, R.D., Mistry, J., Tate, J., Coghill, P., Heger, A., Pollington, J.E. *et al.* (2010) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **38**: D211–D222.
- Fischer, W. (2000) Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res Microbiol* **151**: 421–427.
- Fischer, W., Behr, T., Hartmann, R., Peter-Katalinić, J. y Egge, H. (1993) Teichoic acid and lipoteichoic acid of *Streptococcus pneumoniae* possess identical chain structures. A reinvestigation of teichoic acid (C polysaccharide). *Eur J Biochem* **215**: 851–857.
- Fischetti, V.A. (2010) Bacteriophage endolysins: A novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int J Med Microbiol* **300**: 357–362.
- Flemming, H.-C. y Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623–633.
- Frank, K.L. y Patel, R. (2007) Poly-*N*-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infect Immun* **75**: 4728–4742.
- Fredheim, E.G.A., Granslo, H.N., Flægstad, T., Figenschau, Y., Rohde, H., Sadovskaya, I. *et al.* (2011) *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin activates complement. *FEMS Immunol Med Microbiol* **63**: 269–280.
- Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P. e Ingmer, H. (2007) Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **63**: 1285–1295.
- Frolet, C., Beniazza, M., Roux, L., Gallet, B., Noirclerc-Savoye, M., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2010) New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiol* **10**: 190.
- Fu, W., Forster, T., Mayer, O., Curtin, J.J., Lehman, S.M. y Donlan, R.M. (2010) Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an *in vitro* model system. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 397–404.
- Fuxman, J. I., Russo, D. M., Gabelloni, M. L., Geffner, J. R., Giordano, M., Catalano, M., Zorreguieta, A y Trevani, A. S. (2010) Extracellular DNA: A mayor proinflammatory component of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Immunol* **184**: 6386–6395.
- García, C.C., Russo, R.C., Guabiraba, R., Fagundes, C.T., Polidoro, R.B., Tavares, L.P. *et al.* (2010) Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by influenza A in mice. *PLoS Pathog* **6**: e1001171.
- García, E., Gómez, A., Ronda, C., Escarmís, C. y López, R. (1983) Pneumococcal bacteriophage Cp-1 contains a protein bound to the 5' termini of its DNA. *Virology* **128**: 92–104.
- García, P., Méndez, E., García, E., Ronda, C. y López, R. (1984) Biochemical characterization of a murein hydrolase induced by bacteriophage Dp-1 in *Streptococcus pneumoniae*: comparative study between bacteriophage-associated lysin and host amidase. *J Bacteriol* **159**: 793–796.
- García, E., Ronda, C., García, J.L. y López, R. (1985a) A rapid procedure to detect the autolysin phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **29**: 77–81.

- García, E., García, J.L., Ronda, C., García, P. y López, R. (1985b) Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **201**: 225–230.
- García, P., García, J.L., García, E. y López, R. (1986) Nucleotide sequence and expression of the pneumococcal autolysin gene from its own promoter in *Escherichia coli*. *Gene* **43**: 265–272.
- García, J.L., García, E. y López, R. (1987a) Overproduction and rapid purification of the amidase of *Streptococcus pneumoniae*. *Arch Microbiol* **149**: 52–56.
- García, J.L., García, E., Arrarás, A., García, P., Ronda, C. y López, R. (1987b) Cloning, purification, and biochemical characterization of the pneumococcal bacteriophage Cp-1 lysin. *J Virol* **61**: 2573–2580.
- García, E., García, J.L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J.M. y López, R. (1988a) Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 914–918.
- García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M. y López, R. (1988b) Identification of a lytic enzyme of *Clostridium acetobutylicum* that degrades choline-containing pneumococcal cell walls. *FEMS Microbiol Lett* **52**: 133–138.
- García, P., García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M. y López, R. (1990) Modular organization of the lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Gene* **86**: 81–88.
- García, E., García, P. y López, R. (1993) Cloning and sequencing of a gene involved in the synthesis of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Mol Gen Genet* **239**: 188–195.
- García, J.L., Díaz, E., Romero, A. y García, P. (1994) Carboxy-terminal deletion analysis of the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol* **176**: 4066–4072.
- García, P., González, M.P., García, E., García, J.L. y López, R. (1999a) The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol* **33**: 128–138.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R. y García, J.L. (1999b) LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol* **31**: 1275–1277.
- García, E., Llull, D., Muñoz, R., Mollerach, M. y López, R. (2000a) Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* **151**: 429–435.
- García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., Medrano, F.J. y López, R. (2000b) Versatility of choline-binding domain. En: *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanisms of Disease. A. Tomasz (ed). Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, pp. 231–244.
- García, P., García, J.L., López, R. y García, E. (2005) Pneumococcal phages. En: Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. M.K. Waldor, Friedman, D.L.I. y Adhya, S. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 335–361.
- García-Bustos, J.F. y Tomasz, A. (1987) Teichoic acid-containing muropeptides from *Streptococcus pneumoniae* as substrates for the pneumococcal autolysin. *J Bacteriol* **169**: 447–453.
- García-Castillo, M., Morosini, M.I., Valverde, A., Almaraz, F., Baquero, F., Cantón, R. y del Campo, R. (2007) Differences in biofilm development and antibiotic susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis samples and blood cultures. *J Antimicrob Chemother* **59**: 301–304.
- Gasc, A.M., Kauc, L., Barraillé, P., Sicard, M. y Goodgal, S. (1991) Gene localization, size, and physical map of the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **173**: 7361–7367.
- Gawande, P.V., LoVetri, K., Yakandawala, N., Romeo, T., Zhanel, G.G., Cvitkovitch, D.G. y Madhyastha, S. (2008) Antibiofilm activity of sodium bicarbonate, sodium metaperiodate and SDS combination against dental unit waterline-associated bacteria and yeast. *J Appl Microbiol* **105**: 986–992.
- Geelen, S., Bhattacharyya, C. y Tuomanen, E. (1993) The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* **61**: 1538–1543.
- Gerber, J. y Nau, R. (2010) Mechanisms of injury in bacterial meningitis. *Curr Opin Neurol* **23**: 312–318.

BIBLIOGRAFÍA

- Gieffing, C., Meinke, A.L., Hanner, M., Henics, T., Minh, D.B., Gelbmann, D. *et al.* (2008) Discovery of a novel class of highly conserved vaccine antigens using genomic scale antigenic fingerprinting of pneumococcus with human antibodies. *J Exp Med* **205**: 117–131.
- Gilbert, R.J.C. (2010) Cholesterol-dependent cytolysins. *Adv Exp Med Biol* **677**: 56–66.
- Gillis, L.M., White, H.D., Whitehurst, A. y Sullivan, D.C. (2005) Vancomycin-tolerance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Mississippi during 1999–2001. *Am J Med Sci* **330**: 65–68.
- Goeres, D.M., Loetterle, L.R., Hamilton, M.A., Murga, R., Kirby, D.W. y Donlan, R.M. (2005) Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* **151**: 757–762.
- Golda, A., Malek, N., Dudek, B., Zeglen, S., Wojarski, J., Ochman, M. *et al.* (2011) Infection with human coronavirus NL63 enhances streptococcal adherence to epithelial cells. *J Gen Virol* **92**: 1358–1368.
- Gosink, K.K., Mann, E.R., Guglielmo, C., Tuomanen, E.I. y Masure, H.R. (2000) Role of novel choline binding proteins in virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **68**: 5690–5695.
- Gould, J.M. y Weiser, J.N. (2001) Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infect Immun* **69**: 1747–1754.
- Gram, C. (1884) Ueber die isolirte färbung der schizomycetes in schnitt- und trockenpräparaten. *Fortschr Med* **2**: 185–189.
- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B. y Claverys, J.-P. (2005) Competence-programmed predation of non-competent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8710–8715.
- Günther, F., Wabnitz, G.H., Strohm P., Prior, B., Obst, U., Samstag, Y. *et al.* (2009) Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: Phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Mol Immunol* **46**: 1805–1813.
- Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *J Hyg* **27**: 113–159.
- Gutiérrez-Preciado, A., Henkin, T.M., Grundy, F.J., Yanofsky, C. y Merino, E. (2009) Biochemical features and functional implications of the RNA-based T-box regulatory mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 36–61.
- Hajishengallis, G., Krauss, J.L., Liang, S., McIntosh, M.L. y Lambris, J.D. (2012) Pathogenic microbes and community service through manipulation of innate immunity. *Adv Exp Med Biol* **946**: 69–85.
- Hakenbeck, R., Madhour, A., Denapaite, D. y Brückner, R. (2009) Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 572–586.
- Halfmann, A., Hakenbeck, R. y Brückner, R. (2007a) A new integrative reporter plasmid for *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **268**: 217–224.
- Halfmann, A., Kovács, M., Hakenbeck, R. y Brückner, R. (2007b) Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Mol Microbiol* **66**: 110–126.
- Halfmann, A., Schnorpfel, A., Müller, M., Marx, P., Günzler, U., Hakenbeck, R. y Brückner, R. (2011) Activity of the two-component regulatory system CiaRH in *Streptococcus pneumoniae* R6. *J Mol Microbiol Biotechnol* **20**: 96–104.
- Hall, L.M.C., Whiley, R.A., Duke, B., George, R.C. y Efstratiou, A. (1996) Genetic relatedness within and between serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from the United Kingdom: analysis of multilocus enzyme electrophoresis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance patterns. *J Clin Microbiol* **34**: 853–859.
- Hall-Stoodley, L. y Stoodley, P. (2009) Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* **11**: 1034–1043.
- Hall-Stoodley, L., Hu, F.Z., Gieseke, A., Nistico, L., Nguyen, D., Hayes, J. *et al.* (2006) Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media. *JAMA* **296**: 202–211.

- Hall-Stoodley, L., Nistico, L., Sambanthamoorthy, K., Dice, B., Nguyen, D., Mershon, W.J. *et al.* (2008) Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule down-regulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *BMC Microbiol* **8**: 173.
- Hammerschmidt, S., Talay, S.R., Brandtzaeg, P. y Chhatwal, G.S. (1997) SpsA, a novel pneumococcal surface protein with specific binding to secretory immunoglobulin A and secretory component. *Mol Microbiol* **25**: 1113–1124.
- Hammerschmidt, S., Bethe, G., Remane, P.H. y Chhatwal, G.S. (1999) Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: 1683–1687.
- Hammerschmidt, S., Tillig, M.P., Wolff, S., Vaerman, J.P. y Chhatwal, G.S. (2000) Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of *Streptococcus pneumoniae* via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol* **36**: 726–736.
- Hanage, W.P., Fraser, C. y Spratt, B.G. (2006a) Sequences, sequence clusters and bacterial species. *Phil Trans R Soc B* **361**: 1917–1927.
- Hanage, W.P., Kajjalainen, T., Saukkoriipi, A., Rickcord, J.L. y Spratt, B.G. (2006b) A successful, diverse disease-associated lineage of nontypeable pneumococci that has lost the capsular biosynthesis locus. *J Clin Microbiol* **44**: 743–749.
- Hanage, W.P., Bishop, C.J., Huang, S.S., Stevenson, A.E., Pelton, S.I., Lipsitch, M. y Finkelstein, J.A. (2011) Carried pneumococci in Massachusetts children: the contribution of clonal expansion and serotype switching. *Pediatr Infect Dis J* **30**: 302–308.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557–580.
- Hancock, R.E.W. (2005) Mechanisms of action of newer antibiotics for Gram-positive pathogens. *Lancet Infect Dis* **5**: 209–218.
- Hanfrey, C.C., Pearson, B.M., Hazeldine, S., Lee, J., Gaskin, D.J. Woster P.M. *et al.* (2011) An alternative spermidine biosynthetic route is critical for growth of *Campylobacter jejuni* and is the dominant polyamine pathway in the human gut microbiota. *J Biol Chem* **286**: 43301–43312.
- Hansman, D. y Bullen, M.M. (1967) A resistant pneumococcus. *Lancet* **290**: 264–265.
- Harrington, B.J. y Hageage, G.J. (2003) Calcofluor white: a review of its uses and applications in clinical mycology and parasitology. *Lab Med* **34**: 361–367.
- Hathaway, L.J., Meier, P.S., Battig, P., Aebi, S. y Muhlemann, K. (2004) A homologue of aliB is found in the capsule region of nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**: 3721–3729.
- Hava, D.L. y Camilli, A. (2002) Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* **45**: 1389–1406.
- Håvarstein, L.S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C. y Claverys, J.-P. (2006) New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol* **59**: 1297–1037.
- Hayes, W. (1966) Genetic transformation: a retrospective appreciation. First Griffith Memorial Lecture. *J Gen Microbiol* **45**: 385–397.
- Heilmann, C., Hussain, M., Peters, G. y Götz, F. (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* **24**: 1013–1024.
- Hendrickx, A.P.A., Budzik, J.M., Oh, S.-Y. y Schneewind, O. (2011) Architects at the bacterial surface – sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nat Rev Micro* **9**: 166–176.
- Henrichsen, J. (1995) Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **33**: 2759–2762.
- Henriques, B., Kalin, M., Örtqvist, Å., Olsson Liljequist, B., Almela, M., Marrie, T.J. *et al.* (2000) Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *J Infect Dis* **182**: 833–839.

BIBLIOGRAFÍA

- Henriques Normark, B., Novak, R., Örtqvist, Å., Källenius, G., Tuomanen, E. y Normark, S. (2001) Clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that exhibit tolerance of vancomycin. *Clin Infect Dis* **32**: 552–558.
- Henriques-Normark, B. y Normark, S. (2010) Commensal pathogens, with a focus on *Streptococcus pneumoniae*, and interactions with the human host. *Exp Cell Res* **316**: 1408–1414.
- Hermoso, J.A., Monterroso, B., Albert, A., Galán, B., Ahrazem, O., García, P. *et al.* (2003) Structural basis for selective recognition of pneumococcal cell wall by modular endolysin from phage Cp-1. *Structure* **11**: 1239–1249.
- Hermoso, J.A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M. *et al.* (2005) Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 533–538.
- Hermoso, J.A., García, J.L. y García, P. (2007) Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol* **10**: 461–472.
- Hidalgo, M., Castañeda, E. y Arias, C.A. (2003) Tolerance to vancomycin in a multiresistant, Colombian isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* **52**: 300–302.
- Ho, J.G.S., Greco, A., Rupnik, M. y Ng, K.K.-S. (2005) Crystal structure of receptor-binding C-terminal repeats from *Clostridium difficile* toxin A. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18373–18378.
- Hoa, M., Tomovic, S., Nistico, L., Hall-Stoodley, L., Stoodley, P., Sachdeva, L. *et al.* (2009) Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **73**: 1242–1248.
- Holmes, K. C., Sander, C. y Valencia, A. (1993) A new ATP-binding fold in actin, hexokinase and Hsc70. *Trends Cell Biol* **3**: 53–59.
- Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L. y Jenkinson, H.F. (2001) The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol Microbiol* **41**: 1395–1408.
- Höltje, J.-V. y Tomasz, A. (1974) Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. *J Biol Chem* **249**: 7032–7034.
- Höltje, J.V. y Tomasz, A. (1976) Purification of the pneumococcal *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J Biol Chem* **251**: 4199–4207.
- Hondoh, H., Kuriki, T. y Matsuura, Y. (2003) Three-dimensional structure and substrate binding of *Bacillus stearothermophilus* neopullulanase. *J Mol Biol* **326**: 177–188.
- Honeyman, A.L. y Curtiss, R.I. (1993) Isolation, characterization and nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans* lactose-specific enzyme II (*lacE*) gene of the PTS and the phospho- β -galactosidase (*lacG*) gene. *J Gen Microbiol* **139**: 2685–2694.
- Horne, D.S. y Tomasz, A. (1993) Possible role of a choline-containing teichoic acid in the maintenance of normal cell shape and physiology in *Streptococcus oralis*. *J Bacteriol* **175**: 1717–1722.
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Jr., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S. *et al.* (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* **183**: 5709–5717.
- Hostetter, M.K. (1999) Opsonic and nonopsonic interactions of C3 with *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* **5**: 85–89.
- Houston, P., Rowe, S.E., Pozzi, C., Waters, E.M. y O'Gara, J.P. (2011) Essential role for the major autolysin in the fibronectin-binding protein-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm phenotype. *Infect Immun* **79**: 1153–1165.
- Hsu, C.-Y., Lin, M.-H., Chen, C.-C., Chien, S.-C., Cheng, Y.-H., Su, I.-N., y Shu, J.-C. (2011) Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **63**: 236–247.
- Hughes, J. y Mellows, G. (1978) Inhibition of isoleucyl-transfer ribonucleic acid synthetase in *Escherichia coli* by pseudomonic acid. *Biochem J* **176**: 305–318.

- Hughes, K.A., Sutherland, I.W., Clark, J. y Jones, M.V. (1998) Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases – novel tools for study of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol* **85**: 583–590.
- Hunstad, D.A. y Justice, S.S. (2010) Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **64**: 203–221.
- Huseby, M., Shi, K., Brown, C.K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K.S. *et al.* (2007) Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**: 8719–8726.
- Huseby, M.J., Kruse, A.C., Digre, J., Kohler, P.L., Vocke, J.A., Mann, E.E. *et al.* (2010) Beta toxin catalyzes formation of nucleoprotein matrix in staphylococcal biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 14407–14412.
- Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K. y Brown, J.S. (2010) The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun* **78**: 704–715.
- Institute of Medicine of the National Academies (2003) Food Chemical Codex. The National Academies Press, Washington, DC.
- Ip, W.K.E., Takahashi, K., Ezekowitz, R.A. y Stuart, L.M. (2009) Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* **230**: 9–21.
- Itoh, Y., Wang, X., Hinnebusch, B.J., Preston, J.F. y Romeo, T. (2005) Depolymerization of β -1,6-*N*-acetyl-D-glucosamine disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J Bacteriol* **187**: 382–387.
- Izano, E.A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Mulks, M.H., Velliyagounder, K., Ragunath, C. *et al.* (2007) Poly-*N*-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Pathog* **43**: 1–9.
- Izano, E.A., Amarante, M.A., Kher, W.B. y Kaplan, J.B. (2008) Differential roles of poly-*N*-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **74**: 470–476.
- Izoré, T., Contreras-Martel, C., El Mortaji, L., Manzano, C., Terrasse, R., Vernet, T. *et al.* (2010) Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from *Streptococcus pneumoniae*. *Structure* **18**: 106–115.
- Jack, D.L., Paulsen, I.T. y Saier, M.H. (2000) The amino acid/polyamine/organocation (APC) superfamily of transporters specific for amino acids, polyamines and organocations. *Microbiology* **146**: 1797–1814.
- Jacobs, M.R., Koornhof, H.J., Robins-Browne, R.M., Stevenson, C.M., Vermaak, Z.A., Freiman, I. *et al.* (1978) Emergence of multiply resistant pneumococci. *N Engl J Med* **299**: 735–740.
- Jado, I., López, R., García, E., Fenoll, A., Casal, J. y García, P. (2003) Phage lytic enzymes as therapy of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother* **52**: 967–973.
- Janeway, C. (2005) Immunobiology: the immune system in health and disease. Garland Science, New York, NY.
- Janoff, E.N., Fasching, C., Orenstein, J.M., Rubins, J.B., Opstad, N.L. y Dalmasso, A.P. (1999) Killing of *Streptococcus pneumoniae* by capsular polysaccharide-specific polymeric IgA, complement, and phagocytes. *J Clin Invest* **104**: 1139–1147.
- Jansson, P-E., Kenne, L., Liedgren, H., Lindberg, B. y Lönnngren, J. (1976) A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. *Chem Commun (Stockholm Univ)* **8**: 1–75 (<http://www.stenutz.eu/yellow/>).
- Jarva, H., Janulczyk, R., Hellwage, J., Zipfel, P.F., Björck, L. y Meri, S. (2002) *Streptococcus pneumoniae* evades complement attack and opsonophagocytosis by expressing the *pspC* locus-encoded Hic protein that binds to short consensus repeats 8–11 of factor H. *J Immunol* **168**: 1886–1894.

BIBLIOGRAFÍA

- Jayakar, H.R., Parvathareddy, J., Fitzpatrick, E.A., Bina, X.R., Bina, J.E., Re, F. *et al.* (2011) A *galU* mutant of *Francisella tularensis* is attenuated for virulence in a murine pulmonary model of tularemia. *BMC Microbiol* **11**: 179.
- Jedrzejewski, M.J. (2006) Unveiling molecular mechanisms of pneumococcal surface protein A interactions with antibodies and lactoferrin. *Clin Chim Acta* **367**: 1–10.
- Jedrzejewski, M.J. (2007) Unveiling molecular mechanisms of bacterial surface proteins: *Streptococcus pneumoniae* as a model organism for structural studies. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2799–2822.
- Jensch, I., Gámez, G., Rothe, M., Ebert, S., Fulde, M., Somplatzki, D. *et al.* (2010) PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. *Mol Microbiol* **77**: 22–43.
- Jensen, P.Ø., Givskov, M., Bjarnsholt, T. y Moser, C. (2010) The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* **59**: 292–305.
- Jeong, J.K., Kwon, O., Lee, Y.M., Oh, D.-B., Lee, J.M., Kim, S. *et al.* (2009) Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* BgaC protein as a novel surface β -galactosidase with specific hydrolysis activity for the Galb1-3GlcNAc moiety of oligosaccharides. *J Bacteriol* **191**: 3011–3023.
- Jerga, A. y Rock, C.O. (2009) Acyl-acyl carrier protein regulates transcription of fatty acid biosynthetic genes via the FabT repressor in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **284**: 15364–15368.
- Johnston, J.W., Myers, L.E., Ochs, M.M., Benjamin, W.H., Jr., Briles, D.E. y Hollingshead, S.K. (2004) Lipoprotein PsaA in virulence of *Streptococcus pneumoniae*: surface accessibility and role in protection from superoxide. *Infect Immun* **72**: 5858–5867.
- Joiner, K., Brown, E., Hammer, C., Warren, K. y Frank, M. (1983) Studies on the mechanism of bacterial resistance to complement-mediated killing. III. C5b-9 deposits stably on rough and type 7 *S. pneumoniae* without causing bacterial killing. *J Immunol* **130**: 845–849.
- Jonas, K., Tomenius, H., Kader, A., Normark, S., Römling, U., Belova, L.M. y Melefors, Ö. (2007) Roles of curli, cellulose and BapA in *Salmonella* biofilm morphology studied by atomic force microscopy. *BMC Microbiol* **7**: 70.
- Jonas, K., Melefors, Ö. y Römling, U. (2009) Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiol* **4**: 341–358.
- Joseph, L.A. y Wright, A.C. (2004) Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 889–893.
- Joshi, H.V., Jedrzejewski, M.J. y de Groot, B.L. (2009) Domain motions of hyaluronan lyase underlying processive hyaluronan translocation. *Proteins* **76**: 30–46.
- Joyce, J.G., Abeygunawardana, C., Xu, Q., Cook, J.C., Hepler, R., Przysiecki, C.T. *et al.* (2003) Isolation, structural characterization, and immunological evaluation of a high-molecular-weight exopolysaccharide from *Staphylococcus aureus*. *Carbohydr Res* **338**: 903–922.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C. y Andrew, P.W. (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol* **6**: 288–301.
- Kadioglu, A., Brewin, H., Härtel, T., Brittan, J.L., Klein, M., Hammerschmidt, S. y Jenkinson, H.F. (2010) Pneumococcal protein PavA is important for nasopharyngeal carriage and development of sepsis. *Mol Oral Med* **25**: 50–60.
- Kaetzel, C.S. (2001) Polymeric Ig receptor: defender of the fort or Trojan Horse? *Curr Biol* **11**: R35–R38.
- Kaetzel, C.S. (2005) The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev* **206**: 83–99.
- Kamath, S., Kapatral, V. y Chakrabarty, A.M. (1998) Cellular function of elastase in *Pseudomonas aeruginosa*: role in the cleavage of nucleoside diphosphate kinase and in alginate synthesis. *Mol Microbiol* **30**: 933–941.

- Kamerling, J.P. (2000) Pneumococcal polysaccharides: A chemical view. En: *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanisms of Disease. A. Tomasz (ed). Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, Inc, pp. 81–114.
- Kanetsuna, F. y Carbonell, L.M. (1970) Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol* **101**: 675–680.
- Kang, Y.-S., Do, Y., Lee, H.-K., Park, S.H., Cheong, C., Lynch, R.M. *et al.* (2006) A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell* **125**: 47–58.
- Kaplan, J.B. (2010) Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res* **89**: 205–218.
- Karatan, E. y Watnick, P. (2009) Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 310–347.
- Karlyshev, A.V., Pallen, M.J. y Wren, B.W. (2000) Single-primer PCR procedure for rapid identification of transposon insertion sites. *BioTechniques* **28**: 1078–1082.
- Kausmally, L., Johnsborg, O., Lunde, M., Knutsen, E. y Håvarstein, L.S. (2005) Choline-binding protein D (CbpD) in *Streptococcus pneumoniae* is essential for competence-induced cell lysis. *J Bacteriol* **187**: 4338–4345.
- Kazmierczak, K.M., Wayne, K.J., Rechtsteiner, A. y Winkler, M.E. (2009) Roles of *rel_{Spn}* in stringent response, global regulation and virulence of serotype 2 *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* **72**: 590–611.
- Kemper, C., Atkinson, J.P. y Hourcade, D.E. (2010) Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol* **28**: 131–155.
- Kilian, M., Poulsen, K., Blomqvist, T., Håvarstein, L.S., Bek-Thomsen, M., Tettelin, H. y Sørensen, U.B.S. (2008) Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One* **3**: e2683.
- Kilpper-Bälz, R., Wenzig, P. y Schleifer, K.H. (1985) Molecular relationships and classification of some viridans streptococci as *Streptococcus oralis* and emended description of *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982). *Int J Syst Bacteriol* **35**: 482–488.
- Kim, J.O., Romero-Steiner, S., Sørensen, U.B.S., Blom, J., Carvalho, M., Barnard, S. *et al.* (1999) Relationship between cell surface carbohydrates and intrastain variation on opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **67**: 2327–2333.
- Kim, S.J., Gershov, D., Ma, X., Brot, N. y Elkon, K.B. (2003) Opsonization of apoptotic cells and its effect on macrophage and T cell immune responses. *Ann N Y Acad Sci* **987**: 68–78.
- King, S.J. (2010) Pneumococcal modification of host sugars: a major contributor to colonization of the human airway? *Mol Oral Microbiol* **25**: 15–24.
- King, S.J., Hippe, K.R. y Weiser, J.N. (2006) Deglycosylation of human glycoconjugates by the sequential activities of exoglycosidases expressed by *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **59**: 961–974.
- Kislak, J.W., Razavi, M.B., Daly, A.K. y Finland, M. (1965) Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci* **250**: 261–268.
- Klein, E. (1884) Micro-organisms and disease. *Practitioner* **XXXII**: 321–352.
- Klickstein, L.B., Barbashov, S.F., Liu, T., Jack, R.M. y Nicholson-Weller, A. (1997) Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity* **7**: 345–355.
- Knutsen, E., Ween, O. y Håvarstein, L.S. (2004) Two separate quorum-sensing systems upregulate transcription of the same ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**: 3078–3085.
- Knutsen, E., Johnsborg, O., Quentin, Y., Claverys, J.-P. y Håvarstein, L.S. (2006) BOX elements modulate gene expression in *Streptococcus pneumoniae*: impact on the fine-tuning of competence development. *J Bacteriol* **188**: 8307–8312.

- Kondos, S.C., Hatfaludi, T., Voskoboinik, I., Trapani, J.A., Law, R.H.P., Whisstock, J.C. y Dunstone, M.A. (2010) The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens* **76**: 341–351.
- Koutsoulis, D., Landry, D. y Guthrie, E.P. (2008) Novel endo- α -N-acetylgalactosaminidases with broader substrate specificity. *Glycobiology* **18**: 799–805.
- Kowalko, J.E. y Seibert, M.E. (2008) The *Streptococcus pneumoniae* competence regulatory system influences respiratory tract colonization. *Infect Immun* **76**: 3131–3140.
- Kraiczy, P. y Würzner, R. (2006) Complement escape of human pathogenic bacteria by acquisition of complement regulators. *Mol Immunol* **43**: 31–44.
- Krarp, A., Sørensen, U.B.S., Matsushita, M., Jensenius, J.C. y Steffen Thiel, S. (2005) Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. *Infect Immun* **73**: 1052–1060.
- Kreikemeyer, B., Gámez, G., Margarit, I., Giard, J.-C., Hammerschmidt, S., Hartke, A. y Podbielski, A. (2011) Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of pilus constituents in major pathogenic *Streptococci* and *Enterococci*. *Int J Med Microbiol* **301**: 240–251.
- Kristian, S.A., Birkenstock, T.A, Sauder, U., Mack, D., Götz, F. y Landmann, R. (2008) Biofilm formation induces C3a release and protects *Staphylococcus epidermidis* from IgG and complement deposition and from neutrophil-dependent killing. *J Infect Dis* **197**: 1028–1035.
- Kwon, K., Hasseman, J., Latham, S., Grose, C., Do, Y., Fleischmann, R.D. *et al.* (2011) Recombinant expression and functional analysis of proteases from *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis*. *BMC Biochem* **12**: 17.
- Kurola, P., Tapiainen, T., Kaijalainen, T., Uhari, M. y Saukkoriipi, A. (2009) Xylitol and capsular gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol* **58**: 1470–1473.
- Kurola, P., Tapiainen, T., Sevander, J., Kaijalainen, T., Leinonen, M., Uhari, M. y Saukkoriipi, A. (2011) Effect of xylitol and other carbon sources on *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and gene expression in vitro. *APMIS* **119**: 135–142.
- Kurono, Y., Shimamura, K., Shigemi, H. y Mogi, G. (1991) Inhibition of bacterial adherence by nasopharyngeal secretions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **100**: 455–458.
- Lacks, S. y Hotchkiss, R.D. (1960) A study of the genetic material determining an enzyme activity in *Pneumococcus*. *Biochim Biophys Acta* **39**: 508–517.
- Lacks, S.A., Lopez, P., Greenberg, B. y Espinosa, M. (1986) Identification and analysis of genes for tetracycline resistance and replication functions in the broad-host-range plasmid pLS1. *J Mol Biol* **192**: 753–765.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Laine, R.A., Esselman, W.J. y Sweeley, C.C. (1972) Gas-liquid chromatography of carbohydrates. *Methods Enzymol* **28**: 159–167.
- Lambris, J.D., Ricklin, D. y Geisbrecht, B.V. (2008) Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol* **6**: 132–142.
- Lammerts van Bueren, A., Higgins, M., Wang, D., Burke, R.D. y Boraston, A.B. (2007) Identification and structural basis of binding to host lung glycogen by streptococcal virulence factors. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 76–84.
- Lammerts van Bueren, A., Ficko-Blean, E., Pluvinage, B., Hehemann, J.-H., Higgins, M. A., Deng, L. *et al.* (2011) The conformation and function of a multimodular glycogen-degrading pneumococcal virulence factor. *Structure* **19**: 640–651.
- Lampe, D.J., Churchill, M.E. y Robertson, H.M. (1996) A purified mariner transposase is sufficient to mediate transposition in vitro. *EMBO J* **15**: 5470–5479.

- Laufer, A.S., Thomas, J.C., Figueira, M., Gent, J.F., Pelton, S.I. y Pettigrew, M.M. (2010) Capacity of serotype 19A and 15B/C *Streptococcus pneumoniae* isolates for experimental otitis media: Implications for the conjugate vaccine. *Vaccine* **28**: 2450–2457.
- Lederberg, J. (1994) The transformation of genetics by DNA: an anniversary celebration of Avery, MacLeod and McCarty (1944) *Genetics* **136**: 423–426.
- Lee, M.S., Dougherty, B.A., Madeo, A.C. y Morrison, D.A. (1999) Construction and analysis of a library for random insertional mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: use for recovery of mutants defective in genetic transformation and for identification of essential genes. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1883–1890.
- Lee, J., Sperandio, V., Frantz, D.E., Longgood, J., Camilli, A., Phillips, M.A. y Michael, A.J. (2009) An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **284**: 9899–9907.
- Lefevre, J.C., Faucon, G., Sicard, A.M. y Gasc, A.M. (1993) DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **31**: 2724–2728.
- Leid, J.G., Shirtliff, M.E. et al. (2002) Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* **70**: 6339–6345.
- Leite, B., Gomes, F., Teixeira, P., Souza, C., Pizzolitto, E. y Oliveira, R. (2011) *Staphylococcus epidermidis* biofilms control by *N*-acetylcysteine and rifampicin *Am J Ther* doi: 10.1097/MJT.1090b1013e318209e318217b.
- LeMieux, J., Hava, D.L., Basset, A. y Camilli, A. (2006) RrgA and RrgB are components of a multisubunit pilus encoded by the *Streptococcus pneumoniae* *rlrA* pathogenicity islet. *Infect Immun* **74**: 2453–2456.
- Lewis, K. (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 107–131.
- Li, J., Glover, D.T., Szalai, A.J., Hollingshead, S.K. y Briles, D.E. (2007) PspA and PspC minimize immune adherence and transfer of pneumococci from erythrocytes to macrophages through their effects on complement activation. *Infect Immun* **75**: 5877–5885.
- Li, Q., Li, Y.X., Stahl, G.L., Thurman, J.M., He, Y. y Tong, H.H. (2011) Essential role of factor B of the alternative complement pathway in complement activation and opsonophagocytosis during acute pneumococcal otitis media in mice. *Infect Immun* **79**: 2578–2585.
- Linder, P. y Jankowsky, E. (2011) From unwinding to clamping – the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev* **12**: 505–516.
- Liñares, J., Tubau, F. y Domínguez, A. (2000) Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Spain: An overview of the 1990's. En: *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanisms of Disease. A. Tomasz (ed). Larchmont, New York: Mary Ann Liebert, pp. 399–407.
- Liñares, J., Ardanuy, C., Pallares, R. y Fenoll, A. (2010) Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* **16**: 402–410.
- Lizcano, A., Chin, T., Sauer, K., Tuomanen, E.I. y Orihuela, C.J. (2010) Early biofilm formation on microtiter plates is not correlated with the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **48**: 124–130.
- Llull, D., Muñoz, R., López, R. y García, E. (1999) A single gene (*tts*) located outside the cap locus directs the formation of *Streptococcus pneumoniae* type 37 capsular polysaccharide: type 37 pneumococci are natural, genetically binary strains. *J Exp Med* **190**: 241–251.
- Llull, D., García, E. y López, R. (2001a) *Tts*, a processive β -glucosyltransferase of *Streptococcus pneumoniae*, directs the synthesis of the branched type 37 capsular polysaccharide in pneumococcus and other Gram-positive species. *J Biol Chem* **276**: 21053–21061.

BIBLIOGRAFÍA

- Llull, D., López, R. y García, E. (2001b) Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci. *Curr Mol Med* **1**: 475–491.
- Llull, D., López, R. y García, E. (2006a) Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol* **44**: 1250–1256.
- Llull, D., López, R. y García, E. (2006b) Skl, a novel choline-binding *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase of *Streptococcus mitis* SK137 containing a CHAP domain. *FEBS Lett* **580**: 1959–1964.
- Loeffler, J.M., Nelson, D. y Fischetti, V.A. (2001) Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* **294**: 2170–2172.
- Löffling, J., Vimberg, V., Battig, P. y Henriques-Normark, B. (2011) Cellular interactions by LPxTG-anchored pneumococcal adhesins and their streptococcal homologues. *Cell Microbiol* **13**: 186–197.
- Loisel, E., Jacquamet, L., Serre, L., Bauvois, C.d., Ferrer, J.L., Vernet, T. *et al.* (2008) AdcAll, a new pneumococcal Zn-binding protein homologous with ABC transporters: biochemical and structural analysis. *J Mol Biol* **381**: 594–606.
- Lönn-Stensrud, J., Petersen, F.C., Benneche, T. y Scheie, A.A. (2007) Synthetic bromated furanone inhibits autoinducer-2-mediated communication and biofilm formation in oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* **22**: 340–346.
- López, R. (2006) Pneumococcus: the sugar-coated bacteria. *Int Microbiol* **9**: 179–190.
- López, R. y García, E. (2004) Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 553–580.
- Lopez, R., Garcia, E., Garcia, P., Ronda, C. y Tomasz, A. (1982) Choline-containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **151**: 1581–1590.
- López, R., Sánchez-Puelles, J.M., García, E., García, J.L., Ronda, C. y García, P. (1986) Isolation, characterization and physiological properties of an autolytic-deficient mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet* **204**: 237–242.
- López, R., García, E., García, P. y García, J.L. (2000) The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? En: *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanisms of Disease. A. Tomasz (ed). Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, Inc. Pub., pp. 197–209.
- López, R., García, E., García, P. y García, J.L. (2004) Cell wall hydrolases. En: *The Pneumococcus*. E.I. Tuomanen, Mitchell, T.J., Morrison, D.A. y Spratt, B.G. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 75–88.
- López, D. y Kolter, R. (2010) Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev* **24**: 1893–1902.
- Low, D.E. (2005) Fluoroquinolone-resistant pneumococci: maybe resistance isn't futile? *Clin Infect Dis* **40**: 236–238.
- Lu, Y-J. y Rock, C.O. (2006) Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **59**: 551–566.
- Lund, E. (1970) On the nomenclature of the pneumococcal types. *Int. J. Syst. Bacteriol* **20**: 321–323.
- Lund, E. y Henrichsen, J. (1978) Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods Microbiol* **12**: 241–262.
- Macchi, A., Ardito, F., Marchese, A., Schito, G.C. y Fadda, G. (2006) Efficacy of *N*-acetyl-cysteine in combination with thiamphenicol in sequential (intramuscular/aerosol) therapy of upper respiratory tract infections even when sustained by bacterial biofilms. *J Chemother* **18**: 507–513.
- Macintyre, S.S., Schultz, D. y Kushner, I. (1982) Biosynthesis of C-reactive protein. *Ann N Y Acad Sci* **389**: 76–87.
- Maestre, J.R., Mateo, M., Méndez, M.L., Aguilar, L., Gimenez, M.J., Alou, L. *et al.* (2010) In vitro interference of β -lactams with biofilm development by prevalent community respiratory tract isolates. *Int J Antimicrob Agents* **35**: 274–277.

- Maestro, B. y Sanz, J.M. (2007) Novel approaches to fight *Streptococcus pneumoniae*. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **2**: 188–196.
- Magee, A.D. y Yother, J. (2001) Requirement for capsule in colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69**: 3755–3761.
- Majchrzykiewicz, J.A., Lubelski, J., Moll, G.N., Kuipers, A., Bijlsma, J.J.E., Kuipers, O.P. y Rink, R. (2010) Production of a class II two-component lantibiotic of *Streptococcus pneumoniae* using the class I nisin synthetic machinery and leader sequence. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 1498–1505.
- Mäkinen, K.K. (2010) Sugar alcohols, caries incidence, and remineralization of caries lesions: a literature review. *Int J Dent* **2010**: 981072.
- Makino, S., Yamamoto, K., Murakami, S., Shirahata, T., Uemura, K., Sawada, T. *et al.* (1998) Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microb Pathog* **25**: 101–109.
- Makino, S.I., Yamamoto, K., Asakura, H. y Shirahata, T. (2000) Surface antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surfaces. *FEMS Microbiol Lett* **186**: 313–317.
- Mann, B., Orihuela, C., Antikainen, J., Gao, G., Sublett, J., Korhonen, T.K. y Tuomanen, E. (2006) Multifunctional role of choline binding protein G in pneumococcal pathogenesis. *Infect Immun* **74**: 821–829.
- Manuel, S.G.A., Ragunath, C., Sait, H.B.R., Izano, E.A., Kaplan, J.B. y Ramasubbu, N. (2007) Role of active-site residues of dispersin B, a biofilm-releasing b-hexosaminidase from a periodontal pathogen, in substrate hydrolysis. *FEBS J* **274**: 5987–5999.
- Marchese, A., Bozzolasco, M., Gualco, L., Debbia, E.A., Schito, G.C. Schito, A.M (2003) Effect of fosfomicin alone and in combination with *N*-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* **22**: S95–S100.
- Markiewski, M.M. y Lambris, J.D. (2007) The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol* **171**: 715–727.
- Marnell, L., Mold, C. y Du Clos, T.W. (2005) C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clin Immunol* **117**: 104–111.
- Marra, A. y Brigham, D. (2001) *Streptococcus pneumoniae* causes experimental meningitis following intranasal and otitis media infections via a nonhematogenous route. *Infect Immun* **69**: 7318–7325.
- Marraffini, L.A., DeDent, A.C. y Schneewind, O. (2006) Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 192–221.
- Marrakchi, H., Choi, K.H. y Rock, C.O. (2002) A new mechanism for anaerobic unsaturated fatty acid formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **277**: 44809–44816.
- Marsh, R., Smith-Vaughan, H., Hare, K.M., Binks, M., Kong, F., Warning, J. *et al.* (2010) The nonserotypeable pneumococcus: phenotypic dynamics in the era of anticapsular vaccines. *J Clin Microbiol* **48**: 831–835.
- Martí, M., Trotonda, M.P., Tormo-Más, M.A., Vergara-Irigaray, M., Cheung, A.L., Lasa, I y Penadés, J.R. (2010) Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect* **12**: 55–64.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T. *et al.* (1992) A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **20**: 3479–3483.
- Martin, B., García, P., Castanie, M.P. y Claverys, J.P. (1995) The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol Microbiol* **15**: 367–379.
- Martin, B., Prudhomme, M., Alloing, G., Granadel, C. y Claverys, J.P. (2000) Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **38**: 867–878.

BIBLIOGRAFÍA

- Martin, M., Turco, J.H., Zegans, M.E., Facklam, R.R., Sodha, S., Elliot, J.A. *et al.* (2003) An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* **348**: 1112–1121.
- Martín, V., Mañes-Lázaro, R., Rodríguez, J.M. y Maldonado-Barragán, A. (2011) *Streptococcus lactarius* sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 1048–1052.
- Martinez, J.E., Romero-Steiner, S., Pilishvili, T., Barnard, S., Schinsky, J., Goldblatt, D. y Carlone, G.M. (1999) A flow cytometric opsonophagocytic assay for measurement of functional antibodies elicited after vaccination with the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**: 581–586.
- Martín-Galiano, A.J., Balsalobre, L., Fenoll, A. y de la Campa, A.G. (2003) Genetic characterization of optochin-susceptible viridans group streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3187–3194.
- Martín-Galiano, A.J., Wells, J. y de la Campa, A.G. (2004) Relationship between codon biased genes, microarray expression values and physiological characteristics of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **150**: 2313–2325.
- Maruyama, Y., Nakamichi, Y., Itoh, T., Mikami, B., Hashimoto, W. y Murata, K. (2009) Substrate specificity of streptococcal unsaturated glucuronyl hydrolases for sulfated glycosaminoglycan. *J Biol Chem* **284**: 18059–18069.
- Matsui, R. y Cvitkovitch, D. (2010) Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol* **5**: 403–417.
- Mavroidi, A., Aanensen, D.M., Godoy, D., Skovsted, I.C., Kalltoft, M.S., Reeves, P.R. *et al.* (2007) Genetic relatedness of the *Streptococcus pneumoniae* capsular biosynthetic loci. *J Bacteriol* **189**: 7841–7855.
- McCarty, M. (1994) A retrospective look: how we identified the pneumococcal transforming substance as DNA. *J Exp Med* **179**: 385–394.
- McCarty, M. y Avery, O.T. (1946) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. II. Effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *J Exp Med* **83**: 89–96.
- McCarty, M., Taylor, H.E. y Avery, O.T. (1946) Biochemical studies of environmental factors essential in transformation of pneumococcal types. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* **11**: 177–183.
- McCullers, J.A. (2006) Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev* **19**: 571–582.
- McCullers, J.A., English, B.K. y Novak, R. (2000) Isolation and characterization of vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the cerebrospinal fluid of a patient who developed recrudescing meningitis. *J Infect Dis* **181**: 369–373.
- McCullers, J.A., Karlström, Å., Iverson, A.R., Loeffler, J.M. y Fischetti, V.A. (2007) Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog* **3**: e28.
- McCullers, J.A., Iverson, A.R., McKeon, R.M. y Murray, P.J. (2008) The platelet activating factor receptor is not required for exacerbation of bacterial pneumonia following influenza. *Scand J Infect Dis* **40**: 11–17.
- McDowell, J.V., Frederick, J., Stamm, L. y Marconi, R.T. (2007) Identification of the gene encoding the FhbB protein of *Treponema denticola*, a highly unique factor H-like protein 1 binding protein. *Infect Immun* **75**: 1050–1054.
- McDowell, J.V., Huang, B., Fenno, J.C. y Marconi, R.T. (2009) Analysis of a unique interaction between the complement regulatory protein factor H and the periodontal pathogen *Treponema denticola*. *Infect Immun* **77**: 1417–1425.
- McDowell, J.V., Frederick, J., Miller, D.P., Goetting-Minesky, M.P., Goodman, H., Fenno, J.C. y Marconi, R.T. (2010) Identification of the primary mechanism of complement evasion by the periodontal pathogen, *Treponema denticola*. *Mol Oral Microbiol* **26**: 140–149.

- McEllistrem, M.C., Ransford, J.V. y Khan, S.A. (2007) Characterization of in vitro biofilm-associated pneumococcal phase variants of a clinically relevant serotype 3 clone. *J Clin Microbiol* **45**: 97–101.
- McFarland, C.R., Snyder, T.L. y McKenzie, R. (1984) Polysaccharide storage in different streptococci. *Microbios* **40**: 7–14.
- McGee, L.K., Klugman, K.P. y Tomasz, A. (2000) Serotypes and clones of antibiotic-resistant pneumococci. En: *Streptococcus pneumoniae*. Molecular Biology & Mechanism of Disease. A. Tomasz (ed). Larchmont, New York, USA: Mary Ann Liebert, Inc. Pub., pp. 375–379.
- Meluleni, G.J., Grout, M., Evans, D.J. y Pier, G.B. (1995) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoïd exopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. *J Immunol* **155**: 2029–2038.
- Meng, J-P., Yin, Y-B., Zhang, X-M., Huang, Y-S., Lan, K., Cui, F. y Xu, S-X. (2008) Identification of *Streptococcus pneumoniae* genes specifically induced in mouse lung tissues. *Can J Microbiol* **54**: 58–65.
- Mitchell, J., Siboo, I.R., Takamatsu, D., Chambers, H.F. y Sullam, P.M. (2007) Mechanism of cell surface expression of the *Streptococcus mitis* platelet binding proteins PblA and PblB. *Mol Microbiol* **64**: 844–857.
- Moens, L., Van Hoeyveld, E., Peetermans, W.E., De Boeck, C., Verhaegen, J. y Bossuyt, X. (2006) Mannose-binding lectin genotype and invasive pneumococcal infection. *Hum Immunol* **67**: 605–611.
- Moffitt, M.C. y Frank, M.M. (1994) Complement resistance in microbes. *Springer Semin Immunopathol* **15**: 327–344.
- Mold, C. y Du Clos, T.W. (2006) C-reactive protein increases cytokine responses to *Streptococcus pneumoniae* through interactions with Fcγ receptors. *J Immunol* **176**: 7598–7604.
- Mold, C., Rodic-Polic, B. y Du Clos, T.W. (2002) Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fcγ receptors. *J Immunol* **168**: 6375–6381.
- Molina, R., González, A., Stelter, M., Pérez-Dorado, I., Kahn, R., Morales, M. *et al.* (2009) Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep* **10**: 246–251.
- Mollerach, M., López, R. y García, E. (1998) Characterization of the *galU* gene of *Streptococcus pneumoniae* encoding a uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase: a gene essential for capsular polysaccharide biosynthesis. *J Exp Med* **188**: 2047–2056.
- Mook-Kanamori, B.B., Geldhoff, M., van der Poll, T. y van de Beek, D. (2011) Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Clin Microbiol Rev* **24**: 557–591.
- Morales, M., García, P., de la Campa, A.G., Liñares, J., Ardanuy, C. y García, E. (2010) Evidence of localized prophage-host recombination in the *lytA* gene encoding the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol* **192**: 2624–2632.
- Morán, F.J., García, C., Pérez-Giraldo, C., Hurtado, C., Blanco, M.T. y Gómez-García, A.C. (1998) Phagocytosis and killing of slime-producing *Staphylococcus epidermidis* by polymorphonuclear leukocytes. Effects of sparflaxacin. *Rev Esp Quimioter* **11**: 52–57.
- Mørch, E. (1942) Diagnostic antipneumococcal sera produced by immunization with one or more types of the pneumococcus. *Acta Pathol Microbiol Scand* **19**: 497–522.
- Morens, D.M., Folkers, G.K. y Fauci, A.S. (2004) The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* **430**: 242–249.
- Mortensen, R.F. y Duszkiwicz, J.A. (1977) Mediation of CRP-dependent phagocytosis through mouse macrophage Fc-receptors. *J Immunol* **119**: 1611–1616.
- Morona, J.K., Morona, R. y Paton, J.C. (1997a) Characterization of the locus encoding the *Streptococcus pneumoniae* type 19F capsular polysaccharide biosynthetic pathway. *Mol Microbiol* **23**: 751–763.

BIBLIOGRAFÍA

- Morona, J.K., Morona, R. y Paton, J.C. (1997b) Molecular and genetic characterization of the capsule biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae* type 19B. *J Bacteriol* **179**: 4953–4958.
- Morona, J.K., Morona, R. y Paton, J.C. (1999a) Analysis of the 5' portion of the type 19A capsule locus identifies two classes of *cpsC*, *cpsD*, and *cpsE* genes in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 3599–3605.
- Morona, J.K., Morona, R. y Paton, J.C. (1999b) Comparative genetics of capsular polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus pneumoniae* types belonging to serogroup 19. *J Bacteriol* **181**: 5355–5364.
- Moschioni, M., Donati, C., Muzzi, A., Masignani, V., Censini, S., Hanage, W.P. *et al.* (2008) *Streptococcus pneumoniae* contains 3 *rlrA* pilus variants that are clonally related. *J Infect Dis* **197**: 888–896.
- Moschioni, M., Emolo, C., Biagini, M., Maccari, S., Pansegrau, W., Donati, C. *et al.* (2010) The two variants of the *Streptococcus pneumoniae* pilus 1 RrgA adhesin retain the same function and elicit cross-protection in vivo. *Infect Immun* **78**: 5033–5042.
- Moscoso, M. y Claverys, J.P. (2004) Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol* **54**: 783–794.
- Moscoso, M. y García, E. (2009) Transcriptional regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis locus of *Streptococcus pneumoniae*: a bioinformatic analysis. *DNA Res* **16**: 177–186.
- Moscoso, M., Obregón, V., López, R., García, J.L. y García, E. (2005) Allelic variation of the polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the mitis group. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8706–8713.
- Moscoso, M., García, E. y López, R. (2006) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. *J Bacteriol* **188**: 7785–7795.
- Moscoso, M., García, E. y López, R. (2009) Pneumococcal biofilms. *Int Microbiol* **12**: 77–85.
- Moscoso, M., Domenech, M. y García, E. (2010) Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol Microbiol* **77**: 1052–1064.
- Moscoso, M., Domenech, M. y García, E. (2011) Vancomycin tolerance in Gram-positive cocci. *Environ Microbiol Rep* **3**: 640–650.
- Mosser, J.L. y Tomasz, A. (1970) Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J Biol Chem* **245**: 287–298.
- Muñoz, R., Mollerach, M., López, R. y García, E. (1997) Molecular organization of the genes required for the synthesis of type 1 capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae*: formation of binary encapsulated pneumococci and identification of cryptic dTDP-rhamnose biosynthesis genes. *Mol Microbiol* **25**: 79–92.
- Muñoz-Almagro, C., Selva, L. y Pallares, R. (2010) Influence of pneumococcal vaccine on the incidence of empyema. *Curr Opin Pulm Med* **16**: 394–398.
- Muñoz-Eliás, E.J., Marcano, J. y Camilli, A. (2008) Isolation of *Streptococcus pneumoniae* biofilm mutants and their characterization during nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* **76**: 5049–5061.
- Muramatsu, H., Tachikui, H., Ushida, H., Song, X., Qiu, Y., Yamamoto, S. y Muramatsu, T. (2009) Molecular cloning and expression of endo- β -N-acetylglucosaminidase D, which acts on the core structure of complex type asparagine-linked oligosaccharides. *J Biochem* **129**: 923–928.
- Needs, P.W. y Selvendran, R.R. (1993) Avoiding oxidative degradation during sodium hydroxide/methyl iodide-mediated carbohydrate methylation in dimethyl sulfoxide. *Carbohydr Res* **245**: 1–10.
- Nelson, D., Loomis, L. y Fischetti, V.A. (2001) Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 4107–4112.
- Nelson, A.L., Ries, J., Bagnoli, F., Dahlberg, S., Fälker, S., Rounioja, S. *et al.* (2007a) RrgA is a pilus-associated adhesin in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **66**: 329–340.

- Nelson, A.L., Roche, A.M., Gould, J.M., Chim, K., Ratner, A.J. y Weiser, J.N. (2007b) Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun* **75**: 83–90.
- Neufeld, F. (1902) Ueber die agglutination der pneumokokken und über die theorien der agglutination. *Z Hyg Infektinskr* **40**: 54–72.
- Nielsen, S.V. y Henrichsen, J. (1992) Capsular types of *Streptococcus pneumoniae* isolated from blood and CSF during 1982–1987. *Clin Infect Dis* **15**: 794–798.
- Nieto, C. y Espinosa, M. (2003) Construction of the mobilizable plasmid pMV158GFP, a derivative of pMV158 that carries the gene encoding the green fluorescent protein. *Plasmid* **49**: 281–285.
- Nistico, L., Kreft, R., Gieseke, A., Coticchia, J.M., Burrows, A., Khampang, P. *et al.* (2011) Adenoid reservoir for pathogenic biofilm bacteria. *J Clin Microbiol* **49**: 1411–1420.
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J. y Jenkinson, H.F. (2009) *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 407–450.
- Nocek, B., Stein, A. J., Jedrzejczak, R., Cuff, M. E., Li, H., Volkart, L. y Joachimiak, A. (2011) Structural studies of ROK fructokinase YdhR from *Bacillus subtilis*: insights into substrate binding and fructose specificity. *J Mol Biol* **406**: 325–342.
- Nuorti, J.P., Whitney, C.G. y Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2010) Prevention of pneumococcal disease among infants and children — Use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **59**: 1–18.
- Obregón, V., García, P., García, E., Fenoll, A., López, R. y García, J.L. (2002) Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J Clin Microbiol* **40**: 2545–2554.
- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N. *et al.* (2009) Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**: 893–902.
- Ochs, M.M., Bartlett, W., Briles, D.E., Hicks, B., Jurkuvenas, A., Lau, P. *et al.* (2008) Vaccine-induced human antibodies to PspA augment complement C3 deposition on *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **44**: 204–214.
- Ogawa, Y., Ooka, T., Shi, F., Ogura, Y., Nakayama, K., Hayashi, T. y Shimoji, Y. (2011) The genome of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, the causative agent of swine erysipelas, reveals new insights into the evolution of firmicutes and the organism's intracellular adaptations. *J Bacteriol* **193**: 2959–2971.
- Oggioni, M.R. y Claverys, J.P. (1999) Repeated extragenic sequences in procaryotic genomes: a proposal for the origin and dynamics of the RUP element in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **145**: 2647–2653.
- Oggioni, M.R., Trappetti, C., Kadioglu, A., Cassone, M., Iannelli, F., Ricci, S. *et al.* (2006) Switch from planktonic to sessile life: a major event in pneumococcal pathogenesis. *Mol Microbiol* **61**: 1196–1210.
- Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Briles, D.E., Cook, J. y Paton, J.C. (2007) Development of a vaccine against invasive pneumococcal disease based on combinations of virulence proteins of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **75**: 350–357.
- Olofsson, A.-C., Hermansson, M. y Elwing, H. (2003) *N*-Acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4814–4822.
- Orihuela, C.J., Radin, J.N., Sublett, J.E., Gao, G., Kaushal, D. y Tuomanen, E.I. (2004) Microarray analysis of pneumococcal gene expression during invasive disease. *Infect Immun* **72**: 5582–5596.
- Ortega, M., Marco, F., Soriano, A., García, E., Martínez, J.A. y Mensa, J. (2003) Lack of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Barcelona, Spain, from 1999 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1976–1978.

BIBLIOGRAFÍA

- Oteo, J., Lázaro, E., de Abajo, F.J., Baquero, F., Campos, J. y Spanish Members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2004) Trends in antimicrobial resistance in 1,968 invasive *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Spanish hospitals (2001 to 2003): decreasing penicillin resistance in children's isolates. *J Clin Microbiol* **42**: 5571–5577.
- O'Toole, G.A. (2004) Jekyll or hide? *Nature* **432**: 680–681.
- O'Toole, G.A. y Kolter, R. (1998) Initiation of biofilms formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449–461.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B. y Kolter, R. (1999) Genetic approaches to study biofilms. *Methods Enzymol* **310**: 91–109.
- Pancholi, V., Fontan, P. y Jin, H. (2003) Plasminogen-mediated group A streptococcal adherence to and pericellular invasion of human pharyngeal cells. *Microb Pathog* **35**: 293–303.
- Parise, G., Mishra, M., Itoh, Y., Romeo, T. y Deora, R. (2007) Role of a putative polysaccharide locus in *Bordetella* biofilm development. *J Bacteriol* **189**: 750–760.
- Park, I.H., Park, S., Hollingshead, S.K. y M. H. Nahm, M.H. (2007a) Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. *Infect. Immun* **75**: 4482–4489.
- Park, I.H., Pritchard, D.G., Cartee, R., Brandao, A., Brandileone, M.C.C. y Nahm, M.H. (2007b) Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* **45**: 1225–1233.
- Parker, D., Soong, G., Planet, P., Brower, J., Ratner, A.J. y Prince, A. (2009) The NanA neuraminidase of *Streptococcus pneumoniae* is involved in biofilm formation. *Infect Immun* **77**: 3722–3730.
- Parry, M.F. y Neu, H.C. (1977) Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. *J Clin Microbiol* **5**: 58–61.
- Pasteur (1881) Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull Acad Med (Paris)* **10**: 94–103.
- Paterson, G.K. y Orihuela, C.J. (2010a) Pneumococcal microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules targeting of the extracellular matrix. *Mol Microbiol* **77**: 1–5.
- Paterson, G.K. y Orihuela, C.J. (2010b) Pneumococci: immunology of the innate host response. *Respirology* **15**: 1057–1063.
- Pérez-Dorado, I., González, A., Morales, M., Sanles, R., Striker, W., Vollmer, W. *et al.* (2010) Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nat Struct Mol Biol* **17**: 576–581.
- Pérez-Giraldo, C., Rodríguez-Benito, A., Morán, F.J., Hurtado, C., Blanco, M.T. y Gómez-García, A.C. (1997) Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* **39**: 643–646.
- Pericone, C.D., Bae, D., Shchepetov, M., McCool, T. y Weiser, J.N. (2002) Short-sequence tandem and nontandem DNA repeats and endogenous hydrogen peroxide production contribute to genetic instability of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **184**: 4392–4399.
- Peterson, S.N., Sung, C.K., Cline, R., Desai, B.V., Snesrud, E.C., Luo, P. *et al.* (2004) Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol Microbiol* **51**: 1051–1070.
- Pettigrew, M.M., Fennie, K.P., York, M.P., Daniels, J. y Ghaffar, F. (2006) Variation in the presence of neuraminidase genes among *Streptococcus pneumoniae* isolates with identical sequence types. *Infect Immun* **74**: 3360–3365.
- Picard, C., Puel, A., Bustamante, J., Ku, C.-L. y Casanova, J.-L. (2003) Primary immunodeficiencies associated with pneumococcal disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* **3**: 451–459.
- Plášek, J. y Hošková, B. (2010) Solvatochromic effect in the optical spectra of calcofluor and its relation to fluorescent staining of yeast cell walls. *J Fluoresc* **20**: 343–352.

- Podvin, L., Reysset, G., Hubert, J. y Sebald, M. (1988) Presence of choline in teichoic acid of *Clostridium acetobutylicum* NI-4 and choline inhibition of autolytic functions. *J Gen Microbiol* **134**: 1603–1609.
- Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Bergmann, S., Rohde, M., Seiler, M. *et al.* (2005) PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun* **73**: 2680–2689.
- Pratten, J. y Ready, D. (2010) Use of biofilm model systems to study antimicrobial susceptibility. *Methods Mol Biol* **642**: 203–215.
- Preston, J.A. y Dockrell, D.H. (2008) Virulence factors in pneumococcal respiratory pathogenesis. *Future Microbiol* **3**: 205–221.
- Prieto, A. (1992) Polisacáridos de *Talaromyces*: su aplicación en quimiotaxonomía. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Proft, T. y Baker, E.N. (2009) Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* **66**: 613–635.
- Prudhomme, M., Camilli, A. y Claverys, J.-P. (2007) In vitro mariner mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*; tools ad traps. En: *Molecular Biology of Streptococci*. R. Hakenbeck, y Chhatwal, S. (eds). Norfolk, UK: Horizon bioscience, pp. 511–518.
- Quin, L.R., Carmicle, S., Dave, S., Pangburn, M.K., Evenhuis, J.P. y McDaniel, L.S. (2005) In vivo binding of complement regulator factor H by *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **192**: 1996–2003.
- Quin, L.R., Moore, Q.C., III, and McDaniel, L.S. (2007) Pneumolysin, PspA, and PspC contribute to pneumococcal evasion of early innate immune responses during bacteremia in mice. *Infect Immun* **75**: 2067–2070.
- Radin, J.N., Orihuela, C.J., Murti, G., Guglielmo, C., Murray, P.J. y Tuomanen, E.I. (2005) β -Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **73**: 7827–7835.
- Rahman, N.M., Maskell, N.A., West, A., Teoh, R., Arnold, A. Mackinlay, C. *et al.* (2011) Intraleural use of tissue plasminogen activator and DNase in pleural infection. *N Engl J Med* **365**: 518–526.
- Rake, G., McKee, C.M., Hamre, D.M. y Houck, C.L. (1944) Studies on penicillin. II. Observations on therapeutic activity and toxicity. *J Immunol* **48**: 271–289.
- Ram, S., Lewis, L.A. y Rice, P.A. (2010) Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy. *Clin Microbiol Rev* **23**: 740–780.
- Ramasubbu, N., Thomas, L.M., Rangunath, C. y Kaplan, J.B. (2005) Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Mol Biol* **349**: 475–486.
- Ramirez, M., Severina, E. y Tomasz, A. (1999) A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **181**: 3618–3625.
- Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., García, P., García, E. y Yuste, J. (2011) Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* **6**: e23626.
- Raphael, G.D., Jeney, E.V., Baraniuk, J.N., Kim, I., Meredith, S.D. y Kaliner, M.A. (1989) Pathophysiology of rhinitis. Lactoferrin and lysozyme in nasal secretions. *J Clin Invest* **84**: 1528–1535.
- Ravin, A.W. (1959) Reciprocal capsular transformations of pneumococci. *J Bacteriol* **77**: 296–309.
- Rayner, C.F.J., Jackson, A.D., Rutman, A., Dewar, A., Mitchell, T.J., Andrew, P.W. *et al.* (1995) Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect Immun* **63**: 442–447.
- Reeves, P.R., Hobbs, M., Valvano, M.A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D. *et al.* (1996) Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Microbiol* **4**: 495–503.
- Reichard, P. (2002) Osvald T. Avery and the Nobel prize in medicine. *J Biol Chem* **277**: 13355–13362.

BIBLIOGRAFÍA

- Reichmann, P., Nuhn, M., Denapaite, D., Brückner, R., Henrich, B., Maurer, P. *et al.* (2011) Genome of *Streptococcus oralis* strain Uo5. *J Bacteriol* **193**: 2888–2889.
- Ren, B., McCrory, M.A., Pass, C., Bullard, D.C., Ballantyne, C.M., Xu, Y. *et al.* (2004) The virulence function of *Streptococcus pneumoniae* surface protein A involves inhibition of complement activation and impairment of complement receptor-mediated protection. *J Immunol* **173**: 7506–7512.
- Renko, M., Valkonen, P., Tapiainen, T., Kontiokari, T., Mattila, P., Knuutila, M. *et al.* (2008) Xylitol-supplemented nutrition enhances bacterial killing and prolongs survival of rats in experimental pneumococcal sepsis. *BMC Microbiol* **8**: 45.
- Resch, G., Moreillon, P. y Fischetti, V.A. (2011) A stable phage lysin (Cpl-1) dimer with increased antipneumococcal activity and decreased plasma clearance. *Int J Antimicrob Agents* **38**: 516–521.
- Reyes-Caballero, H., Guerra, A.J., Jacobsen, F.E., Kazmierczak, K.M., Cowart, D., Koppolu, U.M.K. *et al.* (2011) The metalloregulatory zinc site in *Streptococcus pneumoniae* AdcR, a zinc-activated MarR family repressor. *J Mol Biol* **403**: 197–216.
- Riise, G.C., Qvarfordt, I., Larsson, S., Eliasson, V. y Andersson, B.A. (2000) Inhibitory effect of *N*-acetylcysteine on adherence of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to human oropharyngeal epithelial cells in vitro. *Respiration* **67**: 552–558.
- Rijneveld, A.W., Weijer, S., Florquin, S., Speelman, P., Shimizu, T., Ishii, S. y van der Poll, T. (2004) Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *J Infect Dis* **189**: 711–716.
- Rioux, S., Neyt, C., Di Paolo, E., Turpin, L., Charland, N., Labbé, S. *et al.* (2011) Transcriptional regulation, occurrence and putative role of the Pht family of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **157**: 336–348.
- Robertson, G.T., Ng, W.L., Foley, J., Gilmour, R. y Winkler, M.E. (2002) Global transcriptional analysis of *clpP* mutations of type 2 *Streptococcus pneumoniae* and their effects on physiology and virulence. *J Bacteriol* **184**: 3508–3520.
- Rocha-Estrada, J., Aceves-Diez, A., Guarneros, G. y de la Torre, M. (2010) The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 913–923.
- Rodríguez-Cerrato, V., García, P., del Prado, G., García, E., Gracia, M., Huelves, L. *et al.* (2007a) In vitro interactions of LytA, the major pneumococcal autolysin, with two bacteriophage lytic enzymes (Cpl-1 and Pal), cefotaxime and moxifloxacin against antibiotic-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *J Antimicrob Chemother* **60**: 1159–1162.
- Rodríguez-Cerrato, V., García, P., Huelves, L., García, E., del Prado, G., Gracia, M. *et al.* (2007b) Pneumococcal LytA autolysin, a potent therapeutic agent in experimental peritonitis-sepsis caused by highly β -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 3371–3373.
- Romero, A., Lopez, R. y Garcia, P. (1990a) Characterization of the pneumococcal bacteriophage HB-3 amidase: cloning and expression in *Escherichia coli*. *J Virol* **64**: 137–142.
- Romero, A., Lopez, R. y Garcia, P. (1990b) Sequence of the *Streptococcus pneumoniae* bacteriophage HB-3 amidase reveals high homology with the major host autolysin. *J Bacteriol* **172**: 5064–5070.
- Romero, P., López, R. y García, E. (2004a) Characterization of LytA-like *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidases from two new *Streptococcus mitis* bacteriophages provides insights into the properties of the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol* **186**: 8229–8239.
- Romero, P., López, R. y García, E. (2004b) Genomic organization and molecular analysis of the inducible prophage EJ-1, a mosaic myovirus from an atypical pneumococcus. *Virology* **322**: 239–252.
- Romero, P., Croucher, N.J., Hiller, N.L., Hu, F.Z., Ehrlich, G.D., Bentley, S.D. *et al.* (2009a) Comparative genomic analysis of ten *Streptococcus pneumoniae* temperate bacteriophages. *J Bacteriol* **191**: 4854–4862.
- Romero, P., García, E. y Mitchell, T.J. (2009b) Development of a prophage typing system and analysis of prophage carriage in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 1642–1649.

- Romero-Steiner, S., Libutti, D., Pais, L.B., Dykes, J., Anderson, P., Whitin, J.C. *et al.* (1997) Standardization of an opsonophagocytic assay for the measurement of functional antibody activity against *Streptococcus pneumoniae* using differentiated HL-60 cells. *Clin Diagn Lab Immunol* **4**: 415–422.
- Ronda, C., García, J.L., García, E., Sánchez-Puelles, J.M. y López, R. (1987) Biological role of the pneumococcal amidase. Cloning of the *lytA* gene in *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Biochem* **164**: 621–624.
- Ronda, C., García, J.L. y López, R. (1988) Characterization of genetic transformation in *Streptococcus oralis* NCTC 11427: expression of the pneumococcal amidase in *S. oralis* using a new shuttle vector. *Mol Gen Genet* **215**: 53–57.
- Ronda, C., García, J.L. y López, R. (1989) Infection of *Streptococcus oralis* NCTC 11427 by pneumococcal phages. *FEMS Microbiol Lett* **65**: 187–192.
- Roveta, S., Schito, A.M., Marchese, A. y Schito, G.C. (2007) Activity of moxifloxacin on biofilms produced in vitro by bacterial pathogens involved in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Int J Antimicrob Agents* **30**: 415–421.
- Ryan R.P. y Dow, J.M. (2011) Communication with a growing family: diffusible signal factor (DSF) signaling in bacteria. *Trends Microbiol* **19**: 145–152.
- Rupprecht, T.A., Angele, B., Klein, M., Heesemann, J., Pfister, H.-W., Botto, M. y Koedel, U. (2007) Complement C1q and C3 are critical for the innate immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the central nervous system. *J Immunol* **178**: 1861–1869.
- Sabelnikov, A.G., Greenberg, B. y Lacks, S.A. (1995) An extended –10 promoter alone directs transcription of the *DpnII* operon of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **250**: 144–155.
- Sahu, A. y Lambris, J.D. (2001) Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol Rev* **180**: 35–48.
- Sambou, T., Dinadayala, P., Stadthagen, G., Barilone, N., Bordat, Y., Neyrolles, O. *et al.* (2008) Capsular glucan and intracellular glycogen of *Mycobacterium tuberculosis*: biosynthesis and impact on the persistence in mice. *Mol Microbiol* **70**: 762–774.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchez, C.J., Shivshankar, P., Stol, K., Trakhtenbroit, S., Sullam, P.M., Sauer, K. *et al.* (2010) The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog* **6**: e1001044.
- Sánchez-Beato, A.R. y García, J.L. (1996) Molecular characterization of a family of choline-binding proteins of *Clostridium beijerinckii* NCIB 8052. Evolution and gene redundancy in prokaryotic cell. *Gene* **180**: 13–21.
- Sánchez-Beato, A.R., Ronda, C. y García, J.L. (1995) Tracking the evolution of the bacterial choline-binding domain: molecular characterization of the *Clostridium acetobutylicum* NCIB 8052 *cspA* gene. *J Bacteriol* **177**: 1098–1103.
- Sánchez-Puelles, J.M., Ronda, C., García, J.L., García, P., López, R. y García, E. (1986) Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur J Biochem* **158**: 289–293.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L. y García, E. (1992) Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur J Biochem* **203**: 153–159.
- Sanderson, A.R., Leid, J.G. y Hunsaker, D. (2006) Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* **116**: 1121–1126.
- Sanz, J.M. y García, J.L. (1990) Structural studies of the lysozyme coded by the pneumococcal phage Cp-1. Conformational changes induced by choline. *Eur J Biochem* **187**: 409–416.

BIBLIOGRAFÍA

- Sass, P. y Bierbaum, G. (2007) Lytic activity of recombinant bacteriophage ϕ 11 and ϕ 12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* **73**: 347–352.
- Schaudinn, C., Stoodley, P., Kainović, A., O'Keeffe, T., Costerton, B., Robinson, D. *et al.* (2007) Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts. *Microbe* **2**: 231–237.
- Schaudinn, C., Gorur, A., Keller, D., Sedghizadeh, P.P. y Costerton, J.W. (2009) Periodontitis: an archetypical biofilm disease. *J Am Dent Assoc* **140**: 978–986.
- Schmidt, L.H. y Sesler, C.L. (1943) Development of resistance to penicillin by pneumococci. *Proc Soc Exp Biol Med* **52**: 353–357.
- Schneider, M.C., Exley, R.M., Ram, S., Sim, R.B. y Tang, C.M. (2007) Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol* **15**: 233–240.
- Schommer, N.N., Christner, M., Hentschke, M., Ruckdeschel, K., Aepfelbacher, M. y Rohde, H. (2011) *Staphylococcus epidermidis* uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. *Infect Immun* **79**: 2267–2276.
- Schorey, J.S. y Sweet, L. (2008) The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology* **18**: 832–841.
- Schwandt, L.Q., Van Weissenbruch, R., Stokroos, I., Van der Mei, H.C., Busscher, H.J. y Albers, F.W. (2004) Prevention of biofilm formation by dairy products and *N*-acetylcysteine on voice prostheses in an artificial throat. *Acta Otolaryngol* **124**: 726–731.
- Scott, J.A.G., Brooks, W.A., Peiris, J.S.M., Holtzman, D. y Mulhollan, E.K. (2008) Pneumonia research to reduce childhood mortality in the developing world. *J Clin Invest* **118**: 1291–1300.
- Sebert, M.E., Palmer, L.M., Rosenberg, M. y Weiser, J.N. (2002) Microarray-based identification of *htrA*, a *Streptococcus pneumoniae* gene that is regulated by the CiaRH two-component system and contributes to nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* **70**: 4059–4067.
- Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bächi, B. y Bischoff, M. (2008) *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun* **76**: 2044–2050.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N. y Whittam, T.S. (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* **51**: 873–884.
- Selinger, D.S. y Reed, W.P. (1979) Pneumococcal adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* **23**: 545–548.
- Senkovich, O., Cook, W.J., Mirza, S., Hollingshead, S.K., Protasevich, I.I., Briles, D.E. y Chattopadhyay, D. (2007) Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein A provides insight into microbial defense mechanism. *J Mol Biol* **370**: 701–713.
- Seo, H.S., Cartee, R.T., Pritchard, D.G. y Nahm, M.H. (2008) A new model of pneumococcal lipoteichoic acid structure resolves biochemical, biosynthetic, and serologic inconsistencies of the current model. *J Bacteriol* **190**: 2379–2387.
- Shafeeq, S., Kloosterman, T.G. y Kuipers, O.P. (2011) Transcriptional response of *Streptococcus pneumoniae* to Zn²⁺ limitation and the repressor/activator function of AdcR. *Metallomics* **3**: 609–618.
- Shaffer, M.F., Enders, J.F. y Wu, C.-J. (1936) Studies on natural immunity to Pneumococcus type III. II. Certain distinguishing properties of two strains of Pneumococcus type III varying in their virulence for rabbits, and the reappearance of these properties following R→S reversion of their respective rough derivatives. *J Exp Med* **64**: 281–305.
- Shah, P., Nanduri, B., Swiatlo, E., Ma, Y. y Pendarvis, K. (2011) Polyamine biosynthesis and transport mechanisms are crucial for fitness and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **157**: 504–515.

- Shakhnovich, E.A., King, S.J. y Weiser, J.N. (2002) Neuraminidase expressed by *Streptococcus pneumoniae* desialylates the lipopolysaccharide of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae*: a paradigm for interbacterial competition among pathogens of the human respiratory tract. *Infect Immun* **70**: 7161–7164.
- Shaper, M., Hollingshead, S.K., Benjamin, W.H., Jr. y Briles, D.E. (2004) PspA protects *Streptococcus pneumoniae* from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin. *Infect Immun* **72**: 5031–5040.
- Sharon, N. (2007) Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J Biol Chem* **282**: 2753–2764.
- Shaw, F.L., Elliot, K.A., Kinch, L.N., Fuell, C., Phillips, M.A. y Michael, A.J. (2010) Evolution and multifarious horizontal transfer of an alternative biosynthetic pathway for the alternative polyamine sym-homospermidine. *J Biol Chem* **285**: 14711–14723.
- Sheehan, M.M., García, J.L., López, R. y García, P. (1997) The lytic enzyme of the pneumococcal phage Dp-1: a chimeric lysin of intergeneric origin. *Mol Microbiol* **25**: 717–725.
- Shiau, A.L. y Wu, C.L. (1998) The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. *Microbiol Immunol* **42**: 33–40.
- Shimada, J., Moon, S.K., Lee, H.-Y., Takeshita, T., Pan, H., Woo, J.-I. et al. (2008) Lysozyme M deficiency leads to an increased susceptibility to *Streptococcus pneumoniae*-induced otitis media. *BMC Infect Dis* **8**: 134.
- Siboo, I.R., Bensing, B.A. y Sullam, P.M. (2003) Genomic organization and molecular characterization of SM1, a temperate bacteriophage of *Streptococcus mitis*. *J Bacteriol* **185**: 6968–6975.
- Sicard, N., Oreglia, J. y Estevenon, A.M. (1992) Structure of the gene complementing *uvr-402* in *Streptococcus pneumoniae*: homology with *Escherichia coli uvrB* and the homologous gene in *Micrococcus luteus*. *J Bacteriol* **174**: 2412–2415.
- Simmons, W.L. y Dybvig, K. (2007) Biofilms protect *Mycoplasma pulmonis* cells from lytic effects of complement and gramicidin. *Infect Immun* **75**: 3696–3699.
- Singh, B., Su, Y.-C. y Riesbeck, K. (2010) Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion. *Mol Microbiol* **78**: 545–560.
- Shobha, M.S. y Tharanathan, R.N. (2008) Nonspecific activity of *Bacillus acidopullulyticus* pullulanase on debranching of guar galactomannan. *J Agric Food Chem* **56**: 10858–10864.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V. y Sneath, P.H.A. (1980) Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol* **30**: 225–420.
- Smyth, A.R., Barbato, A., Beydon, N., Bisgaard, H., de Boeck, K., Brand, P. et al. (2010) Respiratory medicines for children: current evidence, unlicensed use and research priorities. *Eur Resp J* **35**: 247–265.
- Söderling, E.M. (2009) Xylitol, mutans streptococci, and dental plaque. *Adv Dent Res* **21**: 74–78.
- Söderling, E., Alaräisänen, L., Scheinin, A. y Mäkinen, K.K. (1987) Effect of xylitol and sorbitol on polysaccharide production by and adhesive properties of *Streptococcus mutans*. *Caries Res* **21**: 109–116.
- Sogo, J.M., Greenstein, M. y Skalka, A. (1976) The circle mode of replication of bacteriophage lambda: the role of covalently closed templates and the formation of mixed catenated dimers. *J Mol Biol* **103**: 537–562.
- Son, J-S, Lee, S-J., Jun, S.Y., Yoon, S.J., Kang, S.H., Paik, H.R. et al. (2010) Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**: 1439–1449.
- Song, J.-H., Ko, K.S., Lee, J.-Y., Baek, J.Y., Oh, W.S., Yoon, H.S. et al. (2005) Identification of essential genes in *Streptococcus pneumoniae* by allelic replacement mutagenesis. *Mol Cells* **19**: 365–374.

BIBLIOGRAFÍA

- Song, X.-M., Connor, W., Hokamp, K., Babiuk, L.A. y Potter, A.A. (2009) Transcriptome studies on *Streptococcus pneumoniae*, illustration of early response genes to THP-1 human macrophages. *Genomics* **93**: 72–82.
- Sørensen, U.B. y Blom, J. (1992) Capsular polysaccharide is linked to the outer surface of type 6A pneumococcal cell walls. *APMIS* **100**: 891–893.
- Soriani, M. y Telford, J.L. (2010) Relevance of pili in pathogenic streptococci pathogenesis and vaccine development. *Future Microbiol* **5**: 735–747.
- Soriano, F., García-Corbeira, P., Ponte, C., Fernández-Roblas, R. y Gadea, I. (1996) Correlation of pharmacodynamic parameters of five β -lactam antibiotics with therapeutic efficacies in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2686–2690.
- Spatafora, G., Rohrer, K., Barnard, D. y Michalek, S. 1995. A *Streptococcus mutans* mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo. *Infect Immun* **63**: 2556–2563.
- Spijkerman, J., van Gils, E.J.M., Veenhoven, R.H., Hak, E., E.P.F., Y., van der Ende, A. *et al.* (2011) Carriage of *Streptococcus pneumoniae* 3 years after start of vaccination program, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* **17**: 584–591.
- Steinrauf, L.K., Shiuan, D., Yang, W.-j. y Chiang, M.Y. (1999) Lysozyme association with nucleic acids. *Biochem Biophys Res Commun* **266**: 366–370.
- Sternberg, G.M. (1881) A fatal form of septicaemia in the rabbit, produced by the subcutaneous injection of human saliva. An experimental research. *Natl Board Health Bull* **2**: 781–783.
- Stevens, N.T., Greene, C.M., O'Gara, J.P. y Humphreys, H. (2009) Biofilm characteristics of *Staphylococcus epidermidis* isolates associated with device-related meningitis. *J Med Microbiol* **58**: 855–862.
- Stoodley, P., Dodds, I., Boyle, J.D. y Lappin-Scott, H.M. (1999) Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol* **85**: 19S–28S.
- Studier, F.W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve and inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**: 37–44.
- Sun, X., Ge, F., Xiao, C.-L., Yin, X.-F., Ge, R., Zhang, L.-H. y He, Q.-Y. (2010) Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res* **9**: 275–282.
- Sun, X., Jia, H.-L., Xiao, C.-L., Yin, X.-F., Yang, X.-Y., Lu, J. *et al.* (2011a) Bacterial proteome of *Streptococcus pneumoniae* through multidimensional separations coupled with LC-MS/MS. *OMICS* **15**: 477–482.
- Sun, X., Yang, X.-Y., Yin, X.-F., Yu, G., Xiao, C.-L., He, X. y He, Q.-Y. (2011b) Proteomic analysis of membrane proteins from *Streptococcus pneumoniae* with multiple separation methods plus high accuracy mass spectrometry. *OMICS* **15**: 683–694.
- Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P. y Morrison, D.A. (2001) An rpsL cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5190–5196.
- Sung, H., Shin, H.B., Kim, M.-N., Lee, K., Kim, E.-C., Song, W. *et al.* (2006) Vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* **44**: 3524–3528.
- Suntharalingam, P. y Cvitkovitch, D.G. (2005) Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends Microbiol* **13**: 3–6.
- Suresh, M.V., Singh, S.K., Ferguson, D.A. y Agrawal, A. (2006) Role of the property of C-reactive protein to activate the classical pathway of complement in protecting mice from pneumococcal infection. *J Immunol* **176**: 4369–4374.
- Suresh, M.V., Singh, S.K., Ferguson, D.A., Jr. y Agrawal, A. (2007) Human C-reactive protein protects mice from *Streptococcus pneumoniae* infection without binding to pneumococcal C-polysaccharide. *J Immunol* **178**: 1158–1163.

- Swank, R.T. y Munkres, K.D. (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal Biochem* **39**: 462–477.
- Swiatlo, E., Champlin, F.R., Holman, S.C., Wilson, W.W. y Watt, J.M. (2002) Contribution of choline-binding proteins to cell surface properties of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **70**: 412–415.
- Swiatlo, E., McDaniel, L.S. y Briles, D.E. (2004) Choline-binding proteins. En: *The Pneumococcus*. E.I. Tuomanen, Mitchell, T.J., Morrison, D.A. y Spratt, B.G. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 49–60.
- Takata, H., Huriki, T., Okada, S., Takesada, Y., Iizuka, M., Minamiura, B. e Imanaka, T. (1992) Action of neopullulanase. Neopullulanase catalyzes both hydrolysis and transglycosylation at α -(1→4)- and α -(1→6)-glucosidic linkages. *J Biol Chem* **267**: 18447–18452.
- Talbot, U.M., Paton, A.W. y Paton, J.C. (1996) Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **64**: 3772–3777.
- Tapiainen, T., Sormunen, R., Kaijalainen, T., Kontiokari, T., Ikaheimo, I. y Uhari, M. (2004) Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. *J Antimicrob Chemother* **54**: 225–228.
- Tapiainen, T., Kujala, T., Kaijalainen, T., Ikaheimo, I., Saukkoriipi, A., Renko, M. et al. (2010) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* isolates from paediatric patients. *APMIS* **118**: 255–260.
- Teizo, F., Misao, M. y Yuichi, E. (2004) The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* **198**: 185–202.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S. et al. (2001) Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **293**: 498–506.
- Thanassi, J.A., Hartman-Neumann, S.L., Dougherty, T.J., Dougherty, B.A. y Pucci, M.J. (2002) Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **30**: 3152–3162.
- Thomas-Rudolph, D., Du Clos, T.W., Snapper, C.M. y Mold, C. (2007) C-reactive protein enhances immunity to *Streptococcus pneumoniae* by targeting uptake to Fc γ R on dendritic cells. *J Immunol* **178**: 7283–7291.
- Thompson, D., Pepys, M.B. y Wood, S.P. (1999) The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* **7**: 169–177.
- To, H. y Nagai, S. (2007) Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clin Vaccine Immunol* **14**: 813–820.
- Tomasz, A. (1967) Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*. *Science* **157**: 694–697.
- Tomasz, A. (1970) Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence. *J Bacteriol* **101**: 860–871.
- Tong, H.H., Blue, L.E., James, M.A. y DeMaria, T.F. (2000) Evaluation of the virulence of a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant in nasopharyngeal colonization and development of otitis media in the chinchilla model. *Infect Immun* **68**: 921–924.
- Tong, H.H., James, M., Grants, I., Liu, X., Shi, G. y DeMaria, T.F. (2001) Comparison of structural changes of cell surface carbohydrates in the eustachian tube epithelium of chinchillas infected with a *Streptococcus pneumoniae* neuraminidase-deficient mutant or its isogenic parent strain. *Microb Pathog* **31**: 309–317.
- Tong, H.H., Li, Y.X., Stahl, G.L. y Thurman, J.M. (2010) Enhanced susceptibility to acute pneumococcal otitis media in mice deficient in complement C1qa, factor B, and factor B/C2. *Infect Immun* **78**: 976–983.
- Ton-That, H., Marraffini, L.A. y Schneewind, O. (2004) Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 269–278.

BIBLIOGRAFÍA

- Trappetti, C., Kadioglu, A., Carter, M., Hayre, J., Iannelli, F., Pozzi, G. *et al.* (2009) Sialic acid: a preventable signal for pneumococcal biofilm formation, colonization, and invasion of the host. *J. Infect. Dis.* **199**: 1497–1505.
- Trappetti, C., Gualdi, L., Di Meola, L., Jain, P., Korir, C., Edmonds, P. *et al.* (2011a) The impact of the competence quorum sensing system on *Streptococcus pneumoniae* biofilms varies depending on the experimental model. *BMC Microbiol* **11**: 75.
- Trappetti, C., Ogunniyi, A. D., Oggioni, M. R. y Paton, J. C. (2011b) Extracellular matrix formation enhances the ability of *Streptococcus pneumoniae* to cause invasive disease. *PLoS One* **6**: e19844.
- Triglia, T., Peterson, M.G. y Kemp, D.J. (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res* **16**: 8186.
- Trouw, L.A. y Daha, M.R. (2011) Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett* **138**: 35–37.
- Uchiyama, S., Carlin, A.F., Khosravi, A., Weiman, S., Banerjee, A., Quach, D. *et al.* (2009) The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J Exp Med* **206**: 1845–1852.
- Uhari, M., Tapiainen, T. y Kontiokari, T. (2000) Xylitol in preventing acute otitis media. *Vaccine* **19**: S144–S147.
- Vaillancourt, K., Bédard, N., Bart, C., Tessier, M., Robitaille, G., Turgeon, N. *et al.* (2008) Role of *galK* and *galM* in galactose metabolism by *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1264–1267.
- Valle, J., Toledo-Arana, A., Berasain, C., Ghigo, J.-M., Amorena, B., Penadés, J.R. y Lasa, I. (2003) SarA and not σ^B is essential for biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **48**: 1075–1087.
- Vallès, X., Roca, A., Lozano, F., Morais, L., Suárez, B., Casals, F. *et al.* (2010) Serotype-specific pneumococcal disease may be influenced by mannose-binding lectin deficiency. *Eur Resp J* **36**: 856–863.
- Vammen, B. (1939) Serological variants of pneumococcus types 9 and 10. *J Immunol* **37**: 359–365.
- van Dam, J.E., Flier, A. y Snippe, H. (1990) Immunogenicity and immunochemistry of *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharides. *Antonie van Leeuwenhoek* **58**: 1–47.
- van der Linden, M., Al-Lahham, A., Nicklas, W. y Reinert, R.R. (2009) Molecular characterization of pneumococcal isolates from pets and laboratory animals. *PLoS One* **4**: e8286.
- van der Ploeg, J.R. (2010) Genome sequence of the temperate bacteriophage PH10 from *Streptococcus oralis*. *Virus Genes* **41**: 450–458.
- van Gils, E.J.M., Veenhoven, R.H., Hak, E., Rodenburg, G.D., Keijzers, W.C.M., Bogaert, D. *et al.* (2010) Pneumococcal conjugate vaccination and nasopharyngeal acquisition of pneumococcal serotype 19A strains. *JAMA* **304**: 1099–1106.
- Vílchez, R., Lemme, A., Balhausen, B., Thiel, V., Schulz, S., Jansen, R. *et al.* (2010) *Streptococcus mutans* inhibit *Candida albicans* hyphal formation by the fatty acid signaling molecule *trans*-2-decenoic acid (SDSF). *ChemBioChem* **11**: 1552–1562.
- Venkatesh, M., Rong, L., Raad, I. y Versalovic, J. (2009) Novel synergistic antibiofilm combinations for salvage of infected catheters. *J Med Microbiol* **58**: 936–944.
- Volanakis, J.E. y Kaplan, M.H. (1971) Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proc Soc Exp Biol Med* **136**: 612–614.
- Vollmer, W. y Tomasz, A. (2000) The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **275**: 20496–20501.
- Vollmer, W. y Tomasz, A. (2001) Identification of the teichoic acid phosphocholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **39**: 1610–1622.
- Vollmer, W. y Tomasz, A. (2002) Peptidoglycan *N*-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **70**: 7176–7178.

- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P. y Foster, S. (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 259–286.
- Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., DeLeo, F.R. y Otto, M. (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* **279**: 54881–54886.
- Waite, R.D., Struthers, J.K. y Dowson, C.G. (2001) Spontaneous sequence duplication within an open reading frame of the pneumococcal type 3 capsule locus causes high-frequency phase variation. *Mol Microbiol* **42**: 1223–1232.
- Waite, R.D., Penfold, D.W., Struthers, J.K. y Dowson, C.G. (2003) Spontaneous sequence duplications within capsule genes *cap8E* and *tts* control phase variation in *Streptococcus pneumoniae* serotypes 8 and 37. *Microbiology* **149**: 497–504.
- Wallace, H.M. (2009) The polyamines: past, present and future. *Essays Biochem* **46**: 1–9.
- Wallis, R., Mitchell, D.A., Schmid, R., Schwaeble, W.J. y Keeble, A.H. (2010) Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology* **215**: 1–11.
- Walport, M.J. (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* **344**: 1058–1066.
- Walker, T.S., Tomlin, K.L., Worthen, G.S., Poch, K.R., Lieber, J.G., Saavedra, M.T. *et al.* (2005) Enhanced *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development mediated by human neutrophils. *Infect Immun* **73**: 3693–3701.
- Wang, X., Preston, J.F. y Romeo, T. (2004) The *pgaABCD* locus of *Escherichia coli* promotes the synthesis of a polysaccharide adhesin required for biofilm formation. *J Bacteriol* **186**: 2724–2734.
- Wang, X.-Y., Kilgore, P.E., Lim, K.A., Wang, S.-M., Lee, J., Deng, W. *et al.* (2011) Influenza and bacterial pathogen coinfections in the 20th century. *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2011**: 146376.
- Ware, D., Watt, J. y Swiatlo, E. (2005) Utilization of putrescine by *Streptococcus pneumoniae* during growth in choline-limited medium. *J Microbiol* **43**: 398–405.
- Watson, D.A., Musher, D.M., Jacobson, J.W. y Verhoef, J. (1993) A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin Infect Dis* **17**: 913–924.
- Watson, D.A. y Musher, D.M. (1994) Traditional and molecular analyses of the genes encoding pneumococcal polysaccharide production: cloning Avery's transforming principle. *Rev Med Microbiol* **5**: 217–223.
- Weinberger, D.M., Harboe, Z.B., Sanders, E.A.M., Ndiritu, M., Klugman, K.P., Rückinger, S. *et al.* (2010) Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: A meta-analysis. *Clin Infect Dis* **51**: 692–699.
- Weichselbaum, A. (1886) Ueber die aetiologie der acuten lungen- und rippenfellentzündungen. *Med Jahrb* **82**: 483–554.
- Weiser, J.N. (2004) Mechanisms of carriage. En: *The Pneumococcus*. E. Tuomanen, Mitchell, T.J., Morrison, D.A. y Spratt, B.G. (eds). Washington, D.C.: ASM Press, pp. 169–182.
- Weiser, J.N., Bae, D., Fasching, C., Scamurra, R.W., Ratner, A.J. y Janoff, E.N. (2003) Antibody-enhanced pneumococcal adherence requires IgA1 protease. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 4215–4220.
- White, B., Robinson, E.S. y Barnes, L.A. (1979) *The Biology of Pneumococcus*. Harvard University Press, Cambridge.
- WHO (2007) Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization — WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* **82**: 93–104.
- WHO (2009) Global literature review of *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* invasive disease among children less than five years of age, 1980–2005. http://whqlibdoc.who.int/hq/2009/WHO_IVB_2009.2002_eng.pdf.

BIBLIOGRAFÍA

- Willis, L.M., Zhang, R., Reid, A., Withers, S.G. y Wakarchuk, W.W. (2009) Mechanistic investigation of the endo- α -N-acetylgalactosaminidase from *Streptococcus pneumoniae* R6. *Biochemistry* **48**: 10334–10341.
- Wilson, R.L., Brown, L.L., Kirkwood-Watts, D., Warren, T.K., Lund, S.A., King, D.S. *et al.* (2006) *Listeria monocytogenes* 10403S HtrA is necessary for resistance to cellular stress and virulence. *Infect Immun* **74**: 765–768.
- Windgassen, E.B., Funtowicz, L., Lunsford, T.N., Harris, L.A. y Mulvagh, S.L. (2011) C-reactive protein and high-sensitivity C-reactive protein: an update for clinicians. *Postgrad Med* **123**: 114–119.
- Winkelstein, J.A. y Tomasz, A. (1978) Activation of the alternative complement pathway by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J Immunol* **120**: 174–178.
- Winkelstein, J.A., Abramovitz, A.S. y Tomasz, A. (1980) Activation of C3 via the alternative complement pathway results in fixation of C3b to the pneumococcal cell wall. *J Immunol* **124**: 2502–2506.
- Witzenrath, M., Schmeck, B., Doehn, J.M., Tschernig, T., Zahlten, J., Loeffler, J.M. *et al.* (2009) Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* **37**: 642–649.
- Wolcott, R.D. y Ehrlich, G.D. (2008) Biofilms and chronic infections. *JAMA* **299**: 2682–2684.
- Wood, W.B. y Smith, M.R. (1949) The inhibition of surface phagocytosis by the capsular "slime layer" of *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* **90**: 85–96.
- Wood, J.L.N., Newton, J.R., Chanter, N. y Mumford, J.A. (2005) Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *J Clin Microbiol* **43**: 120–126.
- Wortham, B.W., Oliveira, M.A., Fetherston, J.D. y Perry, R.D. (2010) Polyamines are required for the expression of key Hms proteins important for *Yersinia pestis* biofilm formation. *Environ Microbiol* **12**: 2034–2047.
- Xu, G., Kiefel, M.J., Wilson, J.C., Andrew, P.W., Oggioni, M.R. y Taylor, G.L. (2011) Three *Streptococcus pneumoniae* sialidases: three different products. *J Am Chem Soc* **133**: 1718–1721.
- Xu, Y., Ma, M., Ippolito, G.C., Schroeder, H.W., Jr, Carroll, M.C. y Volanakis, J.E. (2001) Complement activation in factor D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14577–14582.
- Yadav, G., Prasad, R.L.A., Jha, B.K., Rai, V., Bhakuni, V. y Datta, K. (2009) Evidence for inhibitory interaction of hyaluronan-binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR) with *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase. *J Biol Chem* **284**: 3897–3905.
- Yi, K., Rasmussen, A.W., Gudlavalleti, S.K., Stephens, D.S. y Stojilkovic, I. (2004) Biofilm formation by *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **72**: 6132–6138.
- Yokota, S., Okabayashi, T., Yoto, Y., Hori, T., Tsutsumi, H. y Fujii, N. (2010) Fosfomicin suppresses RS-virus-induced *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* adhesion to respiratory epithelial cells via the platelet-activating factor receptor. *FEMS Microbiol Lett* **310**: 84–90.
- Yother, J. (2004) Capsules. En: *The Pneumococcus*. E.I. Tuomanen, Mitchell, T.J., Morrison, D.A. y Spratt, B.G. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology Press, pp. 30–48.
- Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jönsson, G., Tay, L-S., Hyams, C. *et al.* (2008) Impaired opsonization with C3b and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* in sera from subjects with defects in the classical complement pathway. *Infect Immun* **76**: 3761–3770.
- Zähler, D. y Hakenbeck, R. (2000) The *Streptococcus pneumoniae* beta-galactosidase is a surface protein. *J Bacteriol* **182**: 5919–5921.
- Zähler, D., Kaminski, K., van der Linden, M., Mascher, T., Meral, M. y Hakenbeck, R. (2002) The *ciaR/ciaH* regulatory network of *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**: 211–216.
- Zalacain, M., Biswas, S., Ingraham, K.A., Ambrad, J., Bryant, A., Chalker, A.F. *et al.* (2003) A global approach to identify novel broad-spectrum antibacterial targets among proteins of unknown function. *J Mol Microbiol Biotechnol* **6**: 109–126.

- Zartler, E.R., Porambo, R.J., Anderson, C.L., Chen, L.H., Yu, J. y Nahm, M.H. (2009) Structure of the capsular polysaccharide of pneumococcal serotype 11A reveals a novel acetylglycerol that is the structural basis for 11A subtypes. *J Biol Chem* **284**: 7318–7329.
- Zeng, L., Das, S. y Burne, R.A. (2010) Utilization of lactose and galactose by *Streptococcus mutans*: transport, toxicity, and carbon catabolite repression. *J Bacteriol* **192**: 2434–2444.
- Zhang, J.-R., Mostov, K.E., Lamm, M.E., Nanno, M., Shimida, S., Ohwaki, M. y Tuomanen, E. (2000) The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* **102**: 827–837.
- Zhang, Y., Masi, A.W., Barniak, V., Mountzouros, K., Hostetter, M.K. y Green, B.A. (2001) Recombinant PhpA protein, a unique histidine motif-containing protein from *Streptococcus pneumoniae*, protects mice against intranasal pneumococcal challenge. *Infect Immun* **69**: 3827–3836.
- Zhang, Z., Li, W., Frolet, C., Bao, R., di Guilmi, A.-M., Vernet, T. y Chen, Y. (2009) Structure of the choline-binding domain of Spr1274 in *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallogr Section F, Struct Biol Crystall Commun* **65**: 757–761.
- Zhao, T. y Liu, Y. (2010) *N*-acetylcysteine inhibit biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* **10**: 140.
- Zipfel, P.F., Würzner, R. y Skerka, C. (2007) Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Mol Immunol* **44**: 3850–3857.