

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



**TESIS DOCTORAL**

**Mecanismo de patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae* asociados a enfermedad invasiva y enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

**(Pathogenic mechanisms of "*Streptococcus pneumoniae*" involved in invasive disease and chronic obstructive pulmonary disease)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Leire Aguinagalde Salazar**

Director

José Enrique Yuste Lobo

**Madrid, 2017**

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



**TESIS DOCTORAL**

**Mecanismos de patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae* asociados a enfermedad invasiva y enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

**(Pathogenic mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* involved in invasive disease and chronic obstructive pulmonary disease)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE  
DOCTOR PRESENTADA POR:

**LEIRE AGUINAGALDE SALAZAR**

Bajo la dirección del

**Dr. José Enrique Yuste Lobo**

Centro Nacional de Microbiología

Instituto de Salud Carlos III

**Madrid, 2017**



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



**Mecanismos de patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae* asociados a enfermedad invasiva y enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

**(Pathogenic mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* involved in invasive disease and chronic obstructive pulmonary disease)**

**Tesis Doctoral**

**LEIRE AGUINAGALDE SALAZAR**



**Madrid, 2017**



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

**Mecanismos de patogenicidad de *Streptococcus pneumoniae* asociados a enfermedad invasiva y enfermedad pulmonar obstructiva crónica**

**(Pathogenic mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* involved in invasive disease and chronic obstructive pulmonary disease)**

**Tesis doctoral presentada por  
Leire Aguinagalde Salazar  
para optar al Grado de Doctor por la  
Universidad Complutense de Madrid**

**Director:**

**Dr. José Enrique Yuste Lobo  
Instituto de Salud Carlos III**

**Madrid, 2017**



*A mis padres*

*A mi hermana y hermano*



*Ezina ekinez egina*

*Koldo Zuazo, 2005*



## 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:

aa, aminoácido(s).  
ADAM, desintegrinas con dominios de tipo metaloproteinasas.  
AMX, amoxicilina.  
ANOVA, análisis de la varianza.  
AP, vía alternativa del complemento o *alternative pathway*.  
APC, alofocianina.  
ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo o *American Type Culture Collection* (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>).  
BALF, lavado broncoalveolar.  
BD, base de datos.  
BSA, seroalbúmina bovina  
BV, violeta brillante.  
C1-INH, inhibidor de C1 del sistema del complemento.  
C4BP, proteína de unión al factor C4b del complemento. Un regulador negativo de la vía clásica y de las lectinas.  
CBD, dominio de unión a colina de las CBPs o *choline-binding domain*.  
CBP, proteína de unión a colina o *coline-binding protein*.  
CBR, repetición de unos 20 aminoácidos que forman parte del CBD o *choline-binding repeat*.  
CC, complejo clonal o *clonal complex*. Conjunto de neumococos cuyos STs difieren entre sí en no más de dos alelos del MLST.  
CD8<sup>+</sup>T, receptor CD8<sup>+</sup> en los linfocitos T.  
CDN, cefditoren.  
CDS, secuencias codificantes del genoma.  
CHL, cloranfenicol.  
CLSI, Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico.  
CLSM, microscopía de barrido láser confocal.  
CMI, concentración mínima inhibitoria.  
CP, vía clásica del complemento o *classical pathway*.  
CPS, polisacárido capsular o *capsular polysaccharide*.  
CR, receptor del complemento en los fagocitos.  
CRO, ceftriaxona.  
CRP, proteína C-reactiva.  
CSP, péptido estimulante de la competencia o *competence-stimulating peptide*.  
CTX, cefotaxima.  
DAMP, mediador de reconocimiento de ligandos endógenos.  
DL<sub>100</sub>, dosis mínima capaz de matar al 100% de los animales infectados en 7 días.  
DMF, dimetilformamida.

DO, densidad óptica.

Doc, desoxicolato sódico.

DS, desviación estándar.

EAEPOC, exacerbaciones agudas asociadas a pacientes con EPOC.

EHT, extracto de humo de tabaco.

ENI, enfermedad neumocócica invasiva o *invasive pneumococcal disease*.

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica o *chronic obstructive pulmonary disease*.

ERY, eritromicina.

FAM-SE, 5,6-carboxifluoresceína, succidinimil éster.

FB, factor B del sistema del complemento.

Fc $\gamma$ R, receptor(es) Fc $\gamma$  de los leucocitos.

Fc, fracción constante de las Igs.

FD, factor D del sistema del complemento.

FEC, volumen espiratorio forzado.

fH, factor H; un regulador negativo de la vía alternativa del sistema del complemento.

fI, factor I; un regulador del sistema del complemento.

FITC, isotiocianato de fluoresceína.

FP, factor P del sistema del complemento o properdina.

FVC, capacidad vital forzada.

GAGs, glicosaminoglicanos sulfatados.

GalNAc, *N*-acetil-D-galactosamina.

GlcNAc, *N*-acetilglucosamina.

GOLD, *Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*. Método empleado por los sistemas de salud para describir el grado de severidad de los pacientes con EPOC.

GWA, asociación del genoma completo o *genome wide association*.

HBSS, tampón salino de Hank o *Hank's balanced salt solution*.

HT, humo de tabaco.

HU, unidades hemolíticas.

ICS, corticoesteroides inhalados

IF, índice de fluorescencia.

IFN, interferón.

IFR, índice relativo de fluorescencia.

Ig, inmunoglobulina

IL-1, interleuquina 1.

In, intranasal.

INDEL, inserción/delección.

Ip, intraperitoneal.

LP, vía de las lectinas o *lectin pathway*.

LPS, lipopolisacárido.

LRR, repeticiones ricas en leucina o *leucine-rich repeats*.

LTA(s), ácido(s) lipoteicoicos.

LytA, NAM-amidasa de neumococo.

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, lectinas unión a manosa o *mannose-binding lectins*. También reciben el nombre conjunto de colectinas.

MFI, intensidad media de fluorescencia.

MLST, tipificación mediante secuenciación multilócica o *Multilocus Sequence Typing*.

MLST, tipificación mediante secuenciación multilocular o *multilocus sequence typing*.

Mpb, millones de pares de bases (o megapares de bases).

MurNAc, ácido *N*-acetilmurámico.

NAM-amidasa, *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa. (EC 3.5.1.28)

NCTC, *National Collection of Type Cultures* (<http://www.hpacultures.org.uk/collections/nctc.jsp>).

NLR, receptor tipo NOD o *NOD-like receptor*.

no-ENI, aislado obtenido de enfermedad neumocócica no invasiva.

nt, nucleótido(s).

NTHi, *Haemophilus influenzae* no tipificables.

OMS, Organización Mundial de la Salud.

OP, opsonofagocitosis.

Opt, optoquina.

ORF, marco de lectura abierto.

PAF, factor de activación plaquetario o *platelet-activating factor*.

PAFr, receptor del PAF.

PAGE, electroforesis en gel de poliacrilamida

PAMP, patrón molecular asociado a patógenos o *pathogen-associated molecular pattern*.

PBP(s), proteína(s) de unión a penicilina o *penicillin-binding protein(s)*.

PBS, solución salina tamponada con fosfato (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 6.8) o *phosphate-buffered saline*.

PCho, fosforilcolina.

PCV10, vacuna conjugada antineumocócica decavalente.

PCV13, vacuna conjugada antineumocócica 13-valente.

PCV7, vacuna conjugada antineumocócica heptavalente.

PE, ficoeritrina.

PEN, penicilina.

PerCP, proteína clorofila peridina-cianina.

PFA, paraformaldehído.

PFGE, electroforesis de DNA en campo pulsante o *pulsed-field gel electrophoresis*.

plgR, receptor polimérico de inmunoglobulinas o *polymeric immunoglobulin recept*.

Ply, neumolisina.

PMN, leucocito(s) polimorfonuclear(es).

PPSV23, vacuna polisacarídica antineumocócica 23-valente.

PRR, receptor(es) de reconocimiento de patrones moleculares o *pattern-recognition receptors*.

PSGL-1, ligando de la glicoproteína P-selectina-1.

-R, resistente.

RFLP, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción o *restriction fragments length polymorphism*.

-S, susceptible.

SAP, proteína amiloide del suero o *serum amyloid protein*.

SBF, suero bovino fetal.

SGM, estreptococo(s) del grupo mitis

SLV, mutante de un clon que difiere de otro en sólo un alelo de los siete MLST o *single locus variant*.

SNP, polimorfismo de un sólo nucleótido o *single nucleotide polymorphism*.

ST(s), secuencitipo(s) o *sequence type*.

TA(s), ácido(s) teicoico(s).

TE, tampón Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM.

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

TIR, receptor de Toll/interleuquina-I.

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

TNF, factor de necrosis tumoral.

TP, vía terminal del complemento o *terminal pathway*.

Tris, tris (hidroximetil) amino metano.

TRITC, isocianato de tetrametil-rodamina.

UFC, unidades formadoras de colonias.

WTA(s), ácido(s) teicoico(s) de pared.

## ÍNDICE

<b>SUMMARY</b> .....	i–vi
<b>RESUMEN</b> .....	vii–xiii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. GENERALIDADES DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i></b> .....	3
<b>1.1. Aspectos históricos</b> .....	3
<b>1.2. Características generales</b> .....	4
<b>1.3. Importancia clínica</b> .....	5
<b>1.4. Factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad neumocócica</b> .....	6
<b>1.5. Prevención de la enfermedad neumocócica</b> .....	6
<b>1.6. Tratamiento y resistencias</b> .....	7
<b>1.7. Tipificación y genes capsulares</b> .....	8
<b>1.8. Pared celular</b> .....	9
1.8.1. Importancia de la fosforilcolina (PCho) .....	9
1.8.2. Características de las proteínas de unión a colina (CBPs) .....	12
<b>2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA</b> .....	15
<b>2.1. Adhesión/colonización del tracto respiratorio</b> .....	16
<b>2.2. Invasión sistémica</b> .....	18
<b>3. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR</b> .....	20
<b>3.1. Inmunidad humoral</b> .....	20
3.1.1. El sistema del complemento .....	20
3.1.1.1. Regulación del sistema del complemento .....	24
3.1.1.2. Inactivación directa por <i>S. pneumoniae</i> .....	25
3.1.2. Reconocimiento de <i>S. pneumoniae</i> por la proteína de fase aguda CRP .....	25
<b>3.1. Inmunidad celular</b> .....	26
3.2.1. TLRs .....	26
3.2.2. Fagocitosis .....	27
3.2.2.1. Receptores del complemento en las células fagocíticas .....	28
3.2.2.2. Receptores Fcγ .....	29
3.2.2.3. El ligando de la glicoproteína P-selectina-1 o PSGL-1 .....	29
<b>4. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)</b> .....	30
<b>4.1. Exacerbaciones agudas en pacientes con EPOC</b> .....	31
<b>4.2. Infección bacteriana crónica en pacientes con EPOC y el sistema de defensa innato</b> .....	32
<b>4.3. Tratamiento antibiótico en EPOC</b> .....	34
<b>5. MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA</b> .....	35
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	37
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	41
<b>1. CEPAS BACTERIANAS Y CRECIMIENTO</b> .....	43
<b>1.1. Estirpes bacterianas y oligonucleótidos</b> .....	43
<b>1.2. Medios y condiciones de cultivo</b> .....	52
<b>1.3. Reactivos y productos</b> .....	53
<b>1.4. Estudios de susceptibilidad antibiótica</b> .....	54
<b>1.5. Obtención de suero humano</b> .....	54
<b>1.6. Obtención de extracto de humo de tabaco</b> .....	54
<b>1.7. Curva de crecimiento</b> .....	55
<b>2. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES ISOGÉNICOS</b> .....	55
<b>2.1. Transformación genética</b> .....	55
<b>3. TÉCNICAS DE ADN</b> .....	56
<b>3.1. Preparación del DNA cromosómico para determinar el genotipo de los aislados clínicos mediante MLST y para la construcción de los diferentes mutantes del estudio</b> ...	56

3.2. Preparación del DNA para secuenciación de genoma completo .....	56
3.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa .....	57
3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	57
3.5. Secuenciación de ADN .....	57
3.6. Serotipificación y tipificación molecular .....	57
3.7. Determinación de las PBPs .....	58
4. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS .....	58
4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS .....	59
4.2. Transferencia a membranas, interacción con anticuerpos y detección .....	59
5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i> CON EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO .....	60
5.1. Depósito del complemento: C3b, C1q, CRP, C4BP y fH .....	60
5.2. Cuantificación de fosforilcolina .....	61
6. OPSONOFAGOCITOSIS DE <i>S. PNEUMONIAE</i> .....	61
6.1. Marcaje fluorescente de <i>S. pneumoniae</i> con FAM-SE .....	61
6.2. OP mediada por neutrófilos polimorfonucleares .....	61
7. ADHESIÓN E INVASIÓN DE <i>S. PNEUMONIAE</i> AL EPITELIO PULMONAR .....	62
8. RECEPTORES CELULARES .....	63
8.1. Expresión de receptores de células epiteliales pulmonares .....	63
8.2. Expresión de receptores de células fagocíticas: PSGL-1, Fc $\gamma$ .....	63
9. BIOFILMES .....	64
9.1. Formación de biofilmes en placas multipocillo .....	64
10. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL .....	64
10.1. Aplicación de la microscopía confocal en la detección de los biofilmes .....	65
10.2. CLSM para el estudio de la interacción de <i>S. pneumoniae</i> con células del hospedador .....	65
10.2.1. Fagocitosis mediada por células HL-60 diferenciada a neutrófilos .....	65
10.2.2. Adhesión e invasión de células epiteliales pulmonares .....	66
11. MODELOS ANIMALES .....	66
11.1. Determinación de la virulencia de los aislados del serotipo 11A y 16F .....	67
11.2. Obtención de cepa virulenta del serotipo 16F de <i>S. pneumoniae</i> en modelos murinos de neumonía bacteriémica .....	67
11.3. Modelo de neumonía neumocócica .....	68
11.4. Cuantificación de niveles de PSGL-1, ADAM8 y células presentadoras de antígeno en sangre periférica y pulmón .....	68
11.4.1. Determinación en sangre periférica .....	68
11.4.2. Determinación en pulmón .....	68
12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	69
13. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	69
13.1. Control de calidad de los datos .....	69
13.2. Programas informáticos .....	69
13.3. Otros .....	70
<b>IV.RESULTADOS</b> .....	71
1. EMERGENCIA DE VARIANTES DE <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS QUE EXPRESAN EL SEROTIPO 11A .....	73
1.1. Evolución epidemiológica de los aislados clínicos del serotipo 11A de <i>S. pneumoniae</i> .....	73
1.2. Caracterización molecular .....	75
1.3. Determinación de las PBPs .....	76
1.4. Reconocimiento de los diferentes genotipos del serotipo 11A de <i>S. pneumoniae</i> por el sistema del complemento .....	77
1.5. Opsonofagocitosis del serotipo 11A .....	80
1.6. Polimorfismo de la NAM-amidasa LytA .....	82
1.7. Formación de biofilmes por los aislados invasivos del serotipo 11A .....	83

<b>2. EFECTO A NIVEL BACTERIANO DE LA EXPOSICIÓN A HT EN LA ENI</b> .....	85
<b>2.1. Caracterización de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedador comparando aislados clínicos de pacientes con EPOC o ENI</b> .....	87
2.1.1. Análisis del contenido de PCho en la superficie bacteriana .....	87
2.1.2. Evasión del sistema del complemento .....	88
2.1.3. Evasión de la opsonofagocitosis mediada por neutrófilos PMNs .....	89
2.1.4. Participación de Pce y LytA en la evasión del sistema del complemento comparando aislados clínicos de pacientes con EPOC o ENI .....	89
2.1.5. Análisis del contenido de PCho en la superficie bacteriana .....	89
2.1.6. Análisis del depósito del CRP y C3b en la superficie bacteriana .....	91
<b>2.2. Impacto del humo de tabaco en la infección neumocócica</b> .....	92
2.2.1. Exposición de aislados clínicos de neumococo al efecto del humo de tabaco .....	92
2.2.2. Análisis del contenido de PCho en la superficie bacteriana en aislados de pacientes con EPOC y aislados de pacientes con ENI expuestos a EHT .....	93
2.2.3. Reconocimiento de los aislados expuestos a HT por la proteína de fase aguda CRP ...	96
2.2.4. Evasión de la opsonofagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares .....	97
2.2.5. Caracterización de las proteínas LytA y Pce de las cepas EPOC, ENI y tipo EPOC ....	99
2.2.5.1. Cuantificación de las proteínas Pce y LytA .....	99
2.2.5.2. Determinación de la actividad lítica de LytA en aislados EPOC, ENI y tipo EPOC ...	100
<b>3. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A HUMO DE TABACO EN LA ENI A NIVEL DEL HOSPEDADOR</b> .....	102
<b>3.1. Análisis del efecto de la exposición a EHT en la interacción entre <i>S. pneumoniae</i> y el epitelio respiratorio</b> .....	102
3.1.1. Efecto del HT en la expresión de receptores del hospedador involucrados en la interacción con microorganismos patógenos .....	102
3.1.2. Análisis del impacto del HT en la adhesión e invasión de las células epiteliales de pulmón .....	102
3.1.3. Interacción de los aislados de pacientes con ENI con el PAFr .....	107
<b>3.2. Estudio del efecto de la exposición a EHT en la interacción entre <i>S. pneumoniae</i> y receptores de las células fagocíticas</b> .....	109
3.2.1. Expresión del receptor PSGL-1 y Fc $\gamma$ en células fagocíticas en presencia de HT .....	109
3.2.2. Efecto del HT en la fagocitosis de <i>S. pneumoniae</i> en ausencia de opsoninas del suero .....	110
<b>3.3. Efecto de los corticoides en la infección neumocócica del tracto respiratorio</b> .....	112
<b>4. MODELOS ANIMALES DE INFECCIÓN NEUMOCÓCICA E IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN AL HT EN LA VIRULENCIA DE NEUMOCOCO</b> .....	114
<b>4.1. Modelo experimental de neumonía neumocócica</b> .....	114
<b>4.2. Modelo murino expuesto a EHT</b> .....	116
4.2.1. Modelo murino de neumonía neumocócica en ratones expuestos a EHT .....	116
4.2.2. Impacto de la exposición al HT sobre la expresión y funcionalidad de PSGL-1 en ratones .....	117
<b>5. ESTUDIO DEL IMPACTO GENÓMICO DEL HT</b> .....	119
<b>5.1. Estudio filogenético de los aislados de neumococo expuestos o no a EHT</b> .....	119
<b>5.2. Análisis del genoma completo de los aislados procedentes de EPOC, ENI y cepas tipo EPOC</b> .....	120
<b>5.3. Marcadores poblacionales</b> .....	120
<b>5.4. Estudio poblacional de aislados de pacientes con EPOC</b> .....	122
<b>5.5. Estudio de genes de neumococo relacionados con la modulación del contenido en PCho</b> .....	124
5.5.1. Análisis genómico de <i>pce</i> .....	125
5.5.2. Análisis genómico de <i>lytA</i> .....	126
<b>5.6. Estudio de genes importantes en la patogénesis de <i>S. pneumoniae</i></b> .....	128
5.6.1. Análisis genómico de <i>ply</i> .....	128
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	131
<b>1. EMERGENCIA DE AISLADOS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS <math>\beta</math>-LACTÁMICOS QUE EXPRESAN EL SEROTIPO 11A</b> .....	133
<b>2. IMPACTO DEL HT EN LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA</b> .....	137

<b>3. PAPEL DE LA AUTOLISINA LYTA Y LA ESTERASA PCE EN LA MODULACIÓN DEL CONTENIDO EN PCCHO DE LOS AISLADOS DE NEUMOCOCO CAPACES DE PERSISTIR EN LOS PULMONES DE PACIENTES CON EPOC</b> .....	146
<b>4. ESTUDIOS GWA Y FILOGENÉTICO DE LOS AISLADOS DE NEUMOCOCO EXPUESTOS O NO A EHT</b> .....	149
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	151
<b>VII. CONCLUSIONS</b> .....	155
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	159
<b>IX. ANEXO I</b> .....	183
<b>X. ANEXO II</b> .....	191

**PATHOGENIC MECHANISMS OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* INVOLVED IN INVASIVE DISEASE AND CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE**

**INTRODUCTION:** *Streptococcus pneumoniae*, the pneumococcus, is an important human pathogen that usually colonizes asymptotically the mucosal surfaces of the upper respiratory tract in early childhood with more than one serotype colonizing the nasopharynx of the same individual at the same time (Bogaert *et al.*, 2004). Once carriage is established, the microorganism may invade several sterile sites, leading to what is known as invasive pneumococcal disease (IPD). Indeed, the pneumococcus is one of the major etiologic agents causing episodes of community-acquired pneumonia, bacteremia and meningitis. However, *S. pneumoniae* is also a major cause of non-invasive diseases such as non-bacteraemic pneumonia, acute otitis media, sinusitis and conjunctivitis, mainly in children, the elderly, and immunocompromised patients (Henriques-Normark and Tuomanen, 2013). More than 25% of the 57 million annual deaths worldwide are estimated to be directly related to infectious diseases. Particularly, respiratory infections are responsible of the death of 4 million people every year. According to the World Health Organization (WHO), estimates of sepsis or pneumonia in neonates and also pneumonia in older children accounted for 15% of the nearly 1 million deaths of children younger than 5 years old reported in 2015, being *Streptococcus pneumoniae* the most common cause of severe pneumonia among children in more and less developed countries (OMS, 2016; UNICEF, 2015; UNICEF and WHO, 2006).

The capsule is considered the main pneumococcal virulence factor and up to 96% distinct capsular polysaccharides (CPS) have been described (Jauneikaite *et al.*, 2015). Current prophylactic measures against pneumococcal infections such as the introduction of PCV7, PCV10 and PCV13, are a highly efficient approach for preventing IPD. Activation of complement cascades by specific antibodies leads to the formation of C3b, the key complement component that is crucial in host defense against pneumococcus by coating the microorganism and stimulating phagocytosis (Markieswski and Lambris, 2007). However, among the main disadvantages of conjugated vaccines are the limited number of serotypes covered and the phenomenon known as “capsular switching” (Coffey *et al.*, 1991) which allows pre-existing clones of *S. pneumoniae* expressing vaccine serotypes to escape vaccine-induced immunity by acquisition of capsular genes from non-vaccine serotypes (Brueggemann *et al.*, 2007; Golubchik *et al.*, 2012).

The major threat to fight IPD is the emergence of strains harbouring high levels of resistance to different antibiotics. In cases where the invading pathogen displays multidrug resistance, antimicrobial concentrations in serum may be insufficient and, therefore, the outcome of the infection will largely depend on the interaction between bacterial virulence factors and host immune mechanisms. In pneumococci, resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics is due to modified penicillin-binding proteins (PBPs), mainly PBP1A, PBP2B and PBP2X, which reduce the affinity for these antibiotics. Both *pbp1a* and *pbp2x* genes are located flanking the capsular locus and, in some cases, the recombinant fragment also includes partial or intact fragments of these genes, leading to the acquisition of a new CPS together with new PBP genes (Ardanuy *et al.*, 2014).

One of the major aims of the current study was to investigate the recent emergence of the penicillin-resistant serotype 11A, that, traditionally, has been penicillin-susceptible over the last three decades. These strains are of big concern as this serotype is not included in the current

conjugate vaccines and the resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics would preclude their use in the treatment of pneumococcal disease in the community.

Active smokers and those exposed to secondhand smoke are at increased risk of bacterial infection. Cigarette smoke (CS) exposure increases the susceptibility to respiratory tract infections, including those caused by *S. pneumoniae*. It has been recently reported that clinical isolates of serotypes 11A and 16F are more frequently associated with episodes of acute exacerbations (AE) in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which are a cause of high morbidity and mortality rates in developed countries and the fourth cause of death worldwide (Domenech *et al.*, 2011). It is quite frequent that COPD patients are persistently colonized by respiratory pathogens, mainly by *Pseudomonas aeruginosa*, non-typeable *Haemophilus influenzae* and *S. pneumoniae*, which contributes to progressive pulmonary damage, increasing the mortality and the risk of death of these patients, due to frequent and recurrent episodes of AECOPD (Domenech *et al.*, 2012a; Garmendia *et al.*, 2012). However, little information is available about the evolution of pneumococci associated with the persistent colonization of the respiratory tract. In addition, the mechanisms causing multiple AE or recurrent pneumonia episodes over long periods of time in patients with chronic respiratory disease are poorly known. Several factors could explain the persistence of pneumococcal strains in patients with COPD. First, it is well known that these patients have a general dysfunction in innate lung defenses, facilitating the permanent colonization by microorganisms (Sethi and Murphy, 2008). Second, the possible biofilm formation in the respiratory tract of these patients may prevent the appropriate diffusion of antibiotics and, therefore, may result in a decrease of the bacterial load but not complete bacterial eradication (Domenech *et al.*, 2012b). Third, the pneumococcal ability to use phosphorylcholine (PCho) expression in order to reduce the immune response to infection might be used by this bacterium to produce persistent infection. In this sense, the acute phase C-reactive protein (CRP) recognizes PCho and can initiate the activation of the classical-pathway (CP), stimulating complement-mediated killing and phagocytosis of *S. pneumoniae*.

The other major goal of this PhD thesis was to establish the molecular, cellular and immunological bases for the persistence of pneumococcal strains causing chronic lung infections in these patients. It is well known that the exposure to CS in smokers is linked to the development of COPD. During tobacco consumption, highly mutagenic components are produced, that could explain the increased rates of community-acquired pneumonia in these patients, due to the effect of CS on the expression of certain pneumococcal virulence factors that may promote both colonization and persistence, which are important precursors for the development of IPD (Koethe *et al.*, 1995; Mutepe *et al.*, 2013). One possibility could be that strains from COPD patients, which have been long term active smokers, might have evolved with the advantage of avoiding more efficiently the host immune response, leading to the persistent phenotype. For this purpose, the effect of CS exposure in several virulence factors of *S. pneumoniae*, as well as cellular receptors and host defense mechanisms have been analyzed in detail.

Although the CPS of *S. pneumoniae* is a fundamental requisite for virulence (López and García, 2004), there are several pneumococcal surface proteins that play important roles in pathogenesis. Among them, one of the major goals of this PhD thesis, was to investigate the impact of CS in different cell wall hydrolases (CWHs) such as LytA and Pce, which belong to the family of the so-called choline-binding proteins (CBP). These proteins are attached to the bacterial surface through non-covalent interactions with the PCho residues present in teichoic and lipoteichoic

acids. CWHs are surface proteins that cleave specific covalent bonds of the cell wall (López and García, 2004), and, therefore, modulate the content of PCho residues on the bacterial surface.

**PRINCIPAL FINDINGS:** For this PhD thesis, we have analyzed the clonal composition of 492 clinical isolates of the serotype 11A causing invasive disease in Spain (2000–2012), and their ability to evade the host immune response. One of the main goals of the research was to carry out a close epidemiological surveillance and to characterize the emerging strains causing IPD to obtain a better understanding of what features lead to the establishment of individual successful clones in the pneumococcal population.

Our study showed some increased proportion of IPD caused by pneumococcal strains of serotype 11A, especially in adults. The timing of this increased proportion coincides in time with the introduction of PCV10 and PCV13 in Spain. Molecular characterization revealed the existence of three different genotypes, the well-known  $\beta$ -lactam susceptible sequence type (ST) ST62<sup>11A</sup> (447 isolates, 90.6%), followed by the emerging clones ST6521<sup>11A</sup> (35 isolates, 7.3%) and ST838<sup>11A</sup> (10 isolates, 2.1%), both penicillin- (PEN) and amoxicillin- (AMX) resistant (R). ST838<sup>11A</sup> was first detected in 2005<sup>11A</sup>, being the first non-susceptible to penicillin clinical isolates among the serotype 11A. Although ST6521 appeared in 2009, it is currently the predominant PEN-resistant clone in children and adults. Both  $\beta$ -lactam-resistant sequence types are variants of Spain<sup>9V</sup>-ST156. ST6521<sup>11A</sup> is a single locus variant (SLV) of ST838, which is indeed, a SLV from ST156, that has been one of the most successful pneumococcal clones disseminated worldwide before PCV7 introduction. The restriction profiles of *pbp2x*, *pbp1a* and *pbp2b* genes were analyzed and it could be found that the PEN-R clones harbour a different *pbp2b* allele in comparison with ST62<sup>11A</sup>.

There exist different virulence factors including the polysaccharide capsule and several proteins of *S. pneumoniae* that are involved in the evasion of complement-mediated immunity. This microorganism uses different strategies including impaired activation and increased inactivation by recruiting complement fluid-phase down-regulators to diminish the protective role of the complement system (Kadioglu *et al.*, 2008; van der Poll and Opal, 2009). The successful increase of the clinical isolates of ST62<sup>11A</sup> and ST6521<sup>11A</sup>, compared to ST838<sup>11A</sup>, was related to an enhanced ability of these isolates to avoid the immune response and phagocytosis. Strains of ST62<sup>11A</sup> and ST6521<sup>11A</sup> showed impaired recognition by C1q and C3b by targeting C4BP—the down-regulator of the classical pathway— leading to a reduced phagocytosis. Moreover, biofilm formation and the polymorphisms of the major autolysin LytA of the different STs were evaluated as a possible mechanism for the evasion of the host immune response. Invasive ST6521<sup>11A</sup> showed a higher capacity to form biofilm than strains of ST838<sup>11A</sup> and ST62<sup>11A</sup>, which has, possibly, contributed to the emergence of this clone in the last few years. However, the study of LytA showed the presence of a mutation in His166-Tyr among the ST62<sup>11A</sup> isolates that enhances the activity of the protein (Morales *et al.*, 2015). This could explain the impaired recognition and phagocytosis of *S. pneumoniae* PEN-susceptible isolates and, therefore, the increased rates of the clinical isolates of ST62<sup>11A</sup>.

The deleterious effect of cigarette smoking in the functionality of the lower respiratory tract and the role of cigarette smoking as a risky behavior for bacterial colonization in COPD patients have been largely studied. Despite intensive investigation, the precise role of bacterial infection in the production and recurrent aspects of COPD needs to be elucidated. Therefore, the main aim of

this part of this study was to investigate the molecular and biological effects of cigarette smoke exposure on bacterial strains and host cells in these patients that lead to the persistent colonization phenotype by *S. pneumoniae* in COPD patients. For this purpose, the selected clinical isolates from COPD patients belonging to serotypes 16F and 11A were compared with IPD isolates of the same serotypes and STs. Moreover, a device to obtain CS extract (CSE) from research cigarettes was developed to expose bacterial isolates and tissue culture cells to the effect of CS to investigate the relationship between CS exposure and the chronic phenotype. Therefore, COPD and IPD strains were grown in presence of 1% of CSE and renamed as super COPD and COPD-like strains, respectively. A flow cytometry assay was used to determine the content of PCho, complement-mediated immunity and phagocytosis exploring if the immune response against the pneumococcus might be impaired in presence of CS.

Molecular mimicry is among the most conserved mechanisms by which bacteria evade immunity, exploiting the host's inability to recognize self-derived molecular structures (Hergott *et al.*, 2015). The pneumococcus, like many other bacteria affecting the respiratory tract, capitalizes on this vulnerability by displaying the host-derived small molecule PCho on its surface. In the present study, we have demonstrated that the amount of PCho expressed on the bacterial surface plays an important role in the evasion of the immune system. Clinical isolates from COPD patients and the strains exposed to CS (super COPD and COPD-like strains) showed a lower content of PCho on the bacterial surface than IPD strains. In addition, these strains were less efficiently recognized by CRP and C3b proteins, which might increase their evasion ability of the host immune response, contributing to the persistent phenotype in the respiratory tract. Our results suggest that pneumococcal strains isolated from COPD patients, that persistently colonize their lungs and had been exposed to CSE, can use the PCho content more efficiently than IPD strains to modulate the host response for bacterial survival.

Moreover, continuous exposure to CS causes deleterious effects on cellular receptors that may alter host-microorganism interaction dynamics (Nadigel *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2014). Based on this, *S. pneumoniae* isolates recovered from COPD, IPD and those exposed to CSE (super COPD and COPD-like strains) were included to investigate their interaction with the respiratory epithelium and professional phagocytic cells. We show here that the expression of Fc $\gamma$ RII and PSGL-1 receptors, which are important in the recognition and clearance of *S. pneumoniae*, are down-regulated when human neutrophils are exposed to 5% CSE. In addition, the results obtained in this PhD thesis confirmed that the persistence of pneumococcal strains in COPD patients could be due, at least in part, to the less efficient ability of human neutrophils to recognize and kill the bacterium. In addition, ADAM8 levels were significantly increased in mice exposed during 2 weeks to CS, which suggests that this metalloprotease acts cleaving more efficiently PSGL-1 from the cell surface. On the same way, this study has confirmed that isolates from COPD patients have an increased ability to adhere to the respiratory epithelium. The CS is a factor that enhances the binding and internalization of *S. pneumoniae* to lung epithelial cells. Furthermore, when these cells were exposed to CS, increased expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and platelet activating factor receptor (PAFr) was observed and higher adhesion and invasion rates to these cells were also found. In addition, the presence of PCho also enhances the invasion throughout the respiratory epithelium due to the interaction of this molecule with the PAFr on host cells. In this Thesis, the importance of PAFr in pneumococcal binding and internalization into the lung cells was explored. The ability of *S. pneumoniae* to modulate the content of PCho on the

bacterial cell wall offers an advantage to the bacterium during the infection processes. Reduction in the content of PCho in COPD isolates impairs the interaction of the microorganism with PAFr, which is beneficial for developing a chronic phenotype.

Using isogenic mutants, the role of the CWHs Pce and LytA modulating the PCho content on the bacterial cell wall was studied, observing a reduction of this molecule in the absence of these proteins in COPD strains. These results suggest a more efficient hydrolysis of PCho in the persistent phenotype strains. However, whole genome sequencing analysis from COPD, IPD and COPD-like strains (n = 80) did not show any mutation in the sequence of the LytA and Pce proteins from COPD and COPD-like strains that could explain the chronic phenotype of these pneumococcal isolates. Unexpectedly, the genetic analysis has provided new insights into the *pce* polymorphism and the possible existence of natural mutants on such important gene in the biology and virulence of *S. pneumoniae*.

**CONCLUSIONS:** This study confirmed the emergence of ST6521<sup>11A</sup>, a vaccine escape variant of Spain<sup>9V</sup>-ST156, which is not included in the current PCV13 vaccine. In addition, isolates of ST6521<sup>11A</sup> showed a high potential to avoid the host immune response by targeting C1q and the down-regulator of the classical pathway, C4BP. Moreover, the higher ability of this ST to produce biofilms may have contributed to the emergence of this PEN-resistant genotype in the last few years. The emergence of invasive variants, penicillin-resistant 11A isolates of the highly successful ST156 clonal complex merits close monitoring.

The findings of the current study demonstrate that the exposure of *S. pneumoniae* to CS contributes to the persistence phenotype of the bacterium in COPD patients by inducing alterations in the bacteria and the host. Our results show that the exposure to CS reduces the amount of PCho expressed on the bacterial cell wall, which increases the ability to avoid the host immune response by a complement-mediated mechanism. In addition, the effect of CS in the expression and functionality of important host receptors involved in bacterial recognition and clearance, such as PAFr and PSGL-1 has been proved, which might explain the persistent phenotype of pneumococcal isolates causing recurrent pneumonia episodes in COPD patients. The genomic analysis of LytA and Pce suggest that changes induced by CS do not affect, at least directly, to the specific protein activity described before. However, the results confirmed the marked polymorphism of the pneumococcal Pce.

#### REFERENCES:

- Ardanuy, C., de la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A., Calatayud, L., Cercenado, E., Pérez-Trallero, E., Bouza, E., and Liñares, J. (2014). Spread of *Streptococcus pneumoniae* serotype 8-ST63 multidrug-resistant recombinant Clone, Spain. *Emerg Infect Dis.* **20**: 1848-1856.
- Bogaert, D., De Groot, R., and Hermans, P.W. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* **4**: 144-154.
- Brueggemann, A.B., Pai, R., Crook, D.W., and Beall, B. (2007). Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog.* **3**: e168.
- Coffey, T.J., Dowson, C.G., Daniels, M., Zhou, J., Martín, C., Spratt, B.G., and Musser, J.M. (1991). Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **5**: 2255-2260.
- Domenech, A., Ardanuy, C., Balsalobre, L., Martí, S., Calatayud, L., De la Campa, A.G., Brueggemann, A.B., and Liñares, J. (2012). Pneumococci can persistently colonize adult patients with chronic respiratory disease. *J Clin Microbiol.* **50**: 4047-4053.

## SUMMARY

- Domenech, A., Ardanuy, C., Calatayud, L., Santos, S., Tubau, F., Grau, I., Verdaguer, R., Dorca, J., Pallarés, R., Martín, R., *et al.* (2011). Serotypes and genotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing pneumonia and acute exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Antimicrob Chemother* **66**: 487-493.
- Feikin, D.R., Kagucia, E.W., Loo, J.D., Link-Gelles, R., Puhan, M.A., Cherian, T., Levine, O.S., Whitney, C.G., O'Brien, K.L., and Moore, M.R. (2013). Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med.* **10**: e1001517.
- Golubchik, T., Brueggemann, A.B., Street, T., Gertz, R.E., Jr., Spencer, C.C., Ho, T., Giannoulatou, E., Link-Gelles, R., Harding, R.M., Beall, B., *et al.* (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nat Genet.* **44**: 352-355.
- Hergott, C.B., Roche, A.M., Naidu, N.A., Mesaros, C., Blair, I.A., and Weiser, J.N. (2015). Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. *J Clin Invest.* **125**: 3878-3890.
- Hermoso, J.A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., and Menéndez, M. (2005). Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat Struct Mol Biol.* **12**: 533-538.
- Jauneikaite, E., Tocheva, A.S., Jefferies, J.M., Gladstone, R.A., Faust, S.N., Christodoulides, M., Hibberd, M.L., and Clarke, S.C. (2015). Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods.* **113**: 41-49.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* **6**: 288-301.
- Koedel, U., Scheld, W.M., and Pfister, H.W. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis.* **2**: 721-736.
- López, R., and García, E. (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev.* **28**: 553-580.
- Markiewski, M.M., and Lambris, J.D. (2007). The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol.* **171**: 715-727.
- Morales, M., Martín-Galiano, A.J., Domenech, M., and García, E. (2015). Insights into the evolutionary relationships of LytA autolysin and Ply pneumolysin-like genes in *Streptococcus pneumoniae* and related streptococci. *Genome Biol Evol.* **7**: 2747-2761.
- Morens, D.M., Folkers, G.K., and Fauci, A.S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* **430**: 242-249.
- Mutepe, N.D., Cockeran, R., Steel, H.C., Theron, A.J., Mitchell, T.J., Feldman, C., and Anderson, R. (2013). Effects of cigarette smoke condensate on pneumococcal biofilm formation and pneumolysin. *European Respir J* **41**: 392-395.
- Nadigel, J., Prefontaine, D., Baglolle, C.J., Maltais, F., Bourbeau, J., Eidelman, D.H., and Hamid, Q. (2011). Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8<sup>+</sup> T cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* **12**: 149.
- O'Brien, K.L., and Levine, O.S. (2006). Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccine. *Lancet.* **368**: 1469-1470.
- OMS (2016). Neumonía. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/>.
- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., Campuzano, S., Moscoso, M., González-Camacho, F., Domenech, M., Rodríguez de Córdoba, S., Sánchez-Madrid, F., Brown, J.S., García, E., *et al.* (2015). Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infection and immunity.* **83**: 591-603.
- Sethi, S., and Murphy, T.F. (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* **359**: 2355-2365.
- Shukla, S.D., Sohal, S.S., Mahmood, M.Q., Reid, D., Muller, H.K., and Walters, E.H. (2014). Airway epithelial platelet-activating factor receptor expression is markedly upregulated in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **9**: 853-861.
- UNICEF (2015). UNICEF global databases 2015. <http://data.unicef.org/child-health/pneumonia.html>.
- UNICEF and WHO (2006). Pneumonia: the forgotten killer of children. [http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia\\_The\\_Forgotten\\_Killer\\_of\\_Children.pdf](http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf)
- van der Poll, T., and Opal, S.M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**: 1543-1556.

**MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*  
ASOCIADOS A ENFERMEDAD INVASIVA Y ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA**

**INTRODUCCIÓN:** *Streptococcus pneumoniae*, también conocido como neumococo, es uno de los patógenos humanos más importantes responsable de infecciones severas tales como neumonía bacteriémica y meningitis, así como de enfermedades no tan graves como neumonía adquirida en la comunidad, otitis media aguda, sinusitis y conjuntivitis (Bogaert *et al.*, 2004), que afectan principalmente a niños, personas mayores de 65 años y pacientes inmunocomprometidos (Koedel *et al.*, 2002; van der Poll y Opal, 2009). La enfermedad neumocócica es precedida por la colonización de la nasofaringe, que es particularmente común en niños con más de un serotipo colonizando simultáneamente (Bogaert *et al.*, 2004). Se calcula que la tercera parte de las muertes anuales que se producen en el mundo son debidas a enfermedades infecciosas y, entre todas ellas, las enfermedades respiratorias son las responsables de la muerte de 4 millones de personas cada año (Morens *et al.*, 2004). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la sepsis, la neumonía neonatal y la neumonía comunitaria en niños más mayores fueron responsables del 15% de las casi un millón de muertes anuales en niños menores de 5 años ocurridas en el 2015, siendo *S. pneumoniae* el causante más frecuente de neumonía infantil severa, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (OMS, 2016; UNICEF, 2015; UNICEF y WHO, 2006).

La capsula polisacáridica está considerada como uno de los principales factores de virulencia de la bacteria (López y García, 2004), de la cual se han descrito más de 96 polisacáridos capsulares (CPS) diferentes (Jauneikaite *et al.*, 2015). Las vacunas conjugadas existentes, como son la PCV7, PCV10 y PCV13, confieren protección frente a la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) (Feikin *et al.*, 2013; O'Brien y Levine, 2006). La activación de la cascada del complemento por anticuerpos específicos conduce a la formación del componente clave C3b, el cual juega un papel crucial en la defensa del hospedador frente a neumococo, recubriendo los microorganismos y estimulando la fagocitosis. Sin embargo, uno de los inconvenientes de las vacunas conjugadas es el limitado número de serotipos frente a los que protegen y, como consecuencia de la introducción de las mismas, el fenómeno conocido como reemplazo de serotipos o “capsular switching” (Coffey *et al.*, 1991), que permite a los clones preexistentes de *S. pneumoniae* que expresan serotipos vacunales escapar de la inmunidad inducida por la vacunación mediante la adquisición de genes capsulares de neumococo no incluidos en las vacunas (Brueggemann *et al.*, 2007; Golubchik *et al.*, 2012).

Una de las principales amenazas a la hora de combatir la ENI es la aparición de cepas con altos niveles de resistencia antibiótica. Cuando el patógeno invasor desarrolla resistencia a uno o múltiples fármacos, las concentraciones empleadas del antimicrobiano dejan de ser suficientes en el suero y, por tanto, el resultado de la infección dependerá, en gran medida, de la interacción entre los factores de virulencia de la bacteria y los mecanismos de defensa del huésped. En neumococo, la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se debe a cambios en las proteínas de unión a penicilina (PBP), principalmente en PBP1A, PBP2B y PBP2X, que reducen la afinidad por estos antibióticos. Los genes *pbp1a* y *pbp2x* se localizan flanqueando el locus capsular y, consecuencia de ello cuando se producen eventos de recombinación capsular, el fragmento recombinante también incluye parte o todo el gen, *pbp1a* o *pbp2x*, dando lugar a la adquisición de un nuevo CPS junto con un nuevo gen de PBP (Ardanuy *et al.*, 2014).

Uno de los principales objetivos de esta Tesis ha sido investigar la emergencia de casos de ENI causados por aislados resistentes a penicilina que expresan el serotipo 11A, susceptible, hasta la fecha, a dicho antibiótico. Estas cepas podrían suponer una importante amenaza puesto que este serotipo no está incluido en las vacunas conjugadas actuales. Además, el hecho de que los aislados emergentes sean resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos agrava la situación, ya que impediría el uso de éstos como tratamiento en la enfermedad neumocócica.

Entre los factores de riesgo que aumentan la susceptibilidad de padecer infecciones de las vías respiratorias, principalmente aquellas causadas por *S. pneumoniae*, destaca el hábito de fumar y, por lo tanto, la exposición al humo de tabaco (HT). Recientemente, se ha descrito que aislados de los serotipo 11A y 16F de *S. pneumoniae* están asociados más frecuentemente a producir episodios de exacerbaciones agudas (EA) en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, como es la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y la cuarta causa de muerte en el mundo (Domenech *et al.*, 2011). Los pacientes con EPOC sufren colonizaciones bacterianas persistentes del tracto respiratorio inferior, principalmente, por *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y *S. pneumoniae*, que contribuyen al progresivo daño pulmonar, que conlleva un incremento de la mortalidad y riesgo de muerte de estos pacientes, debido a los frecuentes y recurrentes episodios de EA (Domenech *et al.*, 2012). Sin embargo, existe poca información acerca de cómo ha evolucionado neumococo para poseer la capacidad de persistir largos periodos de tiempo colonizando y causando EA/EPOC o episodios de neumonía en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas (Domenech *et al.*, 2012; Domenech *et al.*, 2011). Muchos factores podrían explicar la persistencia de neumococo en pacientes con EPOC. En primer lugar, estos pacientes poseen disfunción en la defensa innata pulmonar que facilita la colonización permanente de microorganismos (Sethi y Murphy, 2008). En segundo lugar, la posible formación de biofilmes en el tracto respiratorio de estos pacientes podría dificultar la difusión de los tratamientos antibióticos administrados y contribuir, así a la disminución de la carga bacteriana, pero no a la erradicación de la bacteria (Domenech *et al.*, 2012). En tercer lugar, la capacidad de modular el contenido en fosforilcolina (PCho) de la superficie celular bacteriana como respuesta adaptativa podría ser empleada por la bacteria para eludir la respuesta inmune frente a las infecciones. En este sentido, la presencia de PCho, al ser reconocida por la proteína C-reactiva (CRP) de fase aguda, conduce a la activación de la cascada del complemento, una de las primeras líneas de actuación frente a microorganismos patógenos, y consecuentemente, lleva a la formación del componente clave C3b. De esta manera, permite la opsonización de la bacteria, activar la respuesta inflamatoria mediada por las denominadas anafilotoxinas e inducir la fagocitosis (Markiewski y Lambris, 2007).

Cabe destacar, además, que el tabaquismo es un comportamiento de riesgo muy comúnmente asociado al aumento de la probabilidad de padecer EPOC. Durante la combustión del tabaco, se producen varios componentes con alta capacidad mutagénica que, se ha descrito, podrían ser la explicación de las altas tasas de neumonía adquirida en la comunidad entre estos pacientes, ya que la exposición al HT pueda afectar, entre otros, a la expresión de ciertos genes en los microorganismos que colonizan el tracto respiratorio, influyendo así en la colonización y persistencia de la bacteria, procesos fundamentales para el establecimiento de la ENI (Mutepe *et al.*, 2013).

El principal objetivo de esta parte de la Tesis Doctoral, ha sido caracterizar los posibles cambios genéticos en la bacteria y el hospedador modulados por la exposición al HT que contribuyen

a empeorar el estado de salud, la evolución de la EPOC y que dan lugar a los recurrentes episodios de EA que sufren durante el curso de la enfermedad, suponiendo un gran coste sanitario. Dada la implicación del HT en el desarrollo de esta enfermedad se planteó como posibilidad que las cepas de pacientes con EPOC, los cuales son o han sido fumadores durante largos periodos de tiempo, podrían haber desarrollado cierta ventaja evolutiva para evadir la inmunidad del hospedador y persistir en los pulmones de estos pacientes.

Aunque el CPS de *S. pneumoniae* es un requisito fundamental para la virulencia de la bacteria (López y García, 2004), existen numerosas proteínas de superficie que desempeñan un papel crucial en la patogénesis. Entre ellas, un objetivo de este estudio ha sido investigar el impacto del HT en algunas de las hidrolasas de pared celular, como son LytA y Pce, que pertenecen a la familia de proteínas de unión a colina (CBPs) y que, se ha descrito, participan regulando el contenido de PCho en la superficie celular bacteriana (Hermoso *et al.*, 2005; Ramos-Sevillano *et al.*, 2015).

**RESULTADOS PRINCIPALES:** En este trabajo, se ha analizado la composición clonal de 492 aislados clínicos del serotipo 11A responsables de causar ENI en España entre los años 2000 y 2012, y su habilidad para evadir la respuesta inmune del hospedador. Esto se ha realizado con el objetivo de llevar a cabo la vigilancia y caracterización de los aislados no vacunales emergentes, que causan ENI, y de comprender mejor qué características bacterianas conducen al éxito de ciertos genotipos. Así, se ha demostrado el incremento de la frecuencia del serotipo 11A de *S. pneumoniae* causando ENI en España, especialmente en pacientes adultos, tras la introducción de la vacuna PCV13. La caracterización de estos aislados ha revelado la existencia de 3 secuencitipos (ST) diferentes que expresan este serotipo. El ST62<sup>11A</sup>, el más frecuente (447 aislados, 90.6%) y sensible a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, seguido del ST6521<sup>11A</sup> (35 aislados, 7.3%) y el ST838<sup>11A</sup> (10 aislados, 2.1%). Los neumococos pertenecientes a los dos últimos STs son resistentes (R) a penicilina (PEN) y amoxicilina (AMX). En primer lugar, surgió el ST838<sup>11A</sup>, en el año 2005, siendo los primeros aislados resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos que expresaban el serotipo 11A. Sin embargo, el ST6521<sup>11A</sup> surgió en el año 2009 y es actualmente el secuencitipo PEN-R predominante en niños y adultos. Se ha comprobado que ambos secuencitipos son variantes cercanas del clon Spain<sup>9V</sup>-ST156. El ST6521<sup>11A</sup> surgió por una mutación en un locus (SLV) del MLST respecto al ST838<sup>11A</sup> que, a su vez, surgió de un SLV del ST156. Estos cambios han permitido la adquisición de un nuevo serotipo capsular y la aparición de altos niveles de resistencia en estos STs portando, como causa de ello, un gen *pbp2b* diferente.

Existen distintos factores de virulencia, incluidos el CPS y diversas proteínas de neumococo, que participan en la evasión de la inmunidad mediada por el complemento. Neumococo es capaz de emplear diferentes estrategias para disminuir la activación o aumentar la inactivación del sistema del complemento mediante, por ejemplo, el reclutamiento de reguladores negativos del mismo afectando, de esta manera, al correcto funcionamiento de la respuesta inmune (Kadioglu *et al.*, 2008; van der Poll y Opal, 2009). El éxito de ST62<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup>, en relación a ST838<sup>11A</sup>, se debe a que los primeros poseen una mayor capacidad para evadir la respuesta inmune, dificultan el reconocimiento por los componentes C1q y C3b, debido a un mayor reclutamiento del regulador negativo de la vía clásica del complemento (CP) —el componente C4BP— lo que conduce a una mayor evasión de la fagocitosis. Se ha estudiado la capacidad de formar biofilmes y se ha analizado la secuencia de la principal autolisina de la bacteria, LytA, de los diferentes

secuencitipos como posible mecanismo de evasión de la respuesta inmune. La expansión en los últimos años del ST6521<sup>11A</sup> podría deberse a la mayor capacidad observada en este secuencitipo para formar biofilmes respecto a ST838<sup>11A</sup> y ST62<sup>11A</sup>. Sin embargo, el estudio de LytA mostró la existencia de una mutación en los aislados del ST62<sup>11A</sup> causante del cambio His166-Tyr, el cual es importante desde el punto de vista funcional de la proteína, ya que se ha descrito que incrementa de forma significativa la actividad de ésta (Morales *et al.*, 2015). Esto explicaría la mayor evasión, resistencia a la fagocitosis y, en definitiva, éxito epidemiológico observado en los aislados ST62<sup>11A</sup>.

El efecto deletéreo del hábito de fumar en el tracto respiratorio inferior y la contribución del HT como factor de riesgo para la colonización bacteriana en los pacientes de EPOC, ha sido objeto de múltiples estudios. Sin embargo, el papel del HT sobre la capacidad bacteriana de persistir y producir EA en estos pacientes todavía no está clara. Para determinar el impacto del HT sobre *S. pneumoniae* se seleccionaron aislados clínicos de los serotipos 11A y 16F procedentes de pacientes con EPOC y se compararon con aislados procedentes de ENI de los mismos serotipos y secuencitipos. Además, se desarrolló un dispositivo para obtener extracto de humo de tabaco (EHT) a partir de cigarrillos con el fin de exponer cultivos bacterianos y distintas líneas celulares al efecto nocivo del mismo. De esta manera, los diferentes aislados procedentes de EPOC o ENI se multiplicaron durante pases sucesivos en presencia de 1% de EHT y se renombraron, para diferenciarlos de los aislados silvestres, como cepas súper EPOC o tipo EPOC, respectivamente. Mediante ensayos de citometría de flujo se determinó el contenido en PCho, se comparó la capacidad de evadir la inmunidad mediada por el sistema del complemento y la fagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares (PMN) de los diferentes aislados expuestos o no a EHT, así como se evaluó si la exposición a HT afectaba al reconocimiento de la bacteria por el sistema inmune.

El mimetismo molecular en un mecanismo muy empleado entre las bacterias para evadir la inmunidad, aprovechando, de esta manera, la incapacidad del hospedador para distinguir las estructuras derivadas de sus propias moléculas (Hergott *et al.*, 2015). Neumococo, como muchos otros patógenos, emplea esta estrategia mostrando PCho en la superficie celular. En esta Tesis se ha demostrado que el contenido de este aminoalcohol en la superficie celular bacteriana desempeña un papel fundamental en la evasión del sistema inmune. Los aislados de *S. pneumoniae* procedentes de pacientes con EPOC y aquellos incubados en presencia de EHT (súper EPOC y tipo EPOC), son capaces de modular más eficientemente el contenido en PCho de la envoltura bacteriana que los procedentes de ENI. Además, estas cepas presentaron un menor reconocimiento por las proteínas CRP y C3b, por lo que les permite evadir mejor el sistema inmune del hospedador. Los resultados obtenidos confirman que la disminución del contenido en PCho de la superficie celular de los aislados EPOC se produce como consecuencia a la exposición a HT, lo cual favorece el menor reconocimiento de estos aislados y de los incubados en presencia de EHT por la inmunidad mediada por el complemento y la fagocitosis.

Además, el HT y, por consiguiente, el hábito de fumar, está asociado a cambios en receptores celulares del hospedador que podrían estar involucrados en la interacción huésped-patógeno (Nadigel *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2014). En este sentido, hemos estudiado la interacción de los diferentes aislados clínicos descritos anteriormente con células pulmonares y células fagocíticas profesionales expuestas o no a EHT. Se ha observado que la exposición de neutrófilos a EHT disminuye la expresión de los receptores FcγRII y PSGL-1, importantes en la defensa del hospedador frente a neumococo. Asimismo, los resultados obtenidos de esta Tesis Doctoral sugieren

que la persistencia pulmonar de los aislados procedentes de pacientes EPOC podría deberse, en parte, a la menor capacidad fagocítica de los neutrófilos PMN. Estudios adicionales confirmaron que la reducción de los niveles de PSGL-1, tras la exposición a HT, parece ser debido al aumento de la metaloproteasa ADAM8 que actuaría liberando de manera más eficaz PSGL-1 de la superficie celular. De la misma manera, se ha demostrado que los aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC presentan una mayor adherencia al epitelio pulmonar que los aislados de ENI. Sin embargo, estos últimos poseen una mayor capacidad de invasión. Además, se ha comprobado que las células epiteliales de pulmón en presencia de EHT expresan mayores niveles de TLR4 y del receptor del factor activador plaquetario (PAFr), así como que la exposición al HT incrementa la capacidad de adhesión e invasión de *S. pneumoniae* a estas células. En esta Memoria se destaca el importante papel que posee el PAFr en la unión y translocación de neumococo al interior de las células epiteliales de pulmón en presencia de EHT. La capacidad de modificar la expresión de PCho en la superficie bacteriana, proporciona a la bacteria una ventaja evolutiva durante la infección al hospedador de tal manera que las cepas crónicas, procedentes de pacientes con EPOC, interaccionan menos con el PAFr lo que dificulta su capacidad invasiva pero favorece su cronicidad.

En este estudio, hemos construido mutantes isogénicos en *LytA* y *Pce*, dos hidrolasas de pared celular e importantes factores de virulencia de la bacteria, para analizar su papel regulando el contenido de PCho en la superficie celular bacteriana, participando así en la persistencia pulmonar de *S. pneumoniae* en los pacientes con EPOC. Estos estudios indican que el HT podría contribuir a la mayor eficiencia de estas proteínas modulando el contenido en PCho en los aislados procedentes de EPOC. Sin embargo, el estudio genómico de la secuencia completa de los diferentes aislados clínicos (EPOC, tipo EPOC y ENI) ( $n = 80$ ), no ha permitido identificar ninguna mutación en *LytA* y *Pce* que justifique la mayor actividad de las proteínas y, por tanto, la contribución de éstas al fenotipo crónico de los aislados de *S. pneumoniae*. De manera inesperada, el análisis de la secuencia de *pce* ha revelado la existencia de un gran polimorfismo y la posible aparición de mutantes naturales en un gen tan conocido e importante en la biología y virulencia de neumococo.

**CONCLUSIONES:** Se ha observado la emergencia de aislados clínicos de neumococo del ST6521<sup>11A</sup> —una variante del clon Spain<sup>9V</sup>-ST156 no incluido en la vacuna PCV13— que, además de estar asociados a EAEPOC, poseen una gran capacidad para evadir la fagocitosis mediada por el sistema del complemento al reclutar de un modo muy eficaz C4BP, el regulador negativo de la vía clásica. Estos resultados proponen a este genotipo como un posible clon que podría diseminarse en el futuro con el riesgo añadido de que posee altos niveles de resistencia frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Por otro lado, los resultados derivados de esta Tesis Doctoral, demuestran que el HT contribuye a la persistencia pulmonar de *S. pneumoniae* al producir alteraciones tanto en la bacteria como en el hospedador. La exposición continuada a EHT disminuye el contenido de PCho de la superficie celular bacteriana contribuyendo a la resistencia de *S. pneumoniae* para ser reconocido (y eliminado) por el sistema inmune del hospedador. Nuestros resultados han permitido, asimismo, demostrar que la exposición al HT está asociada a cambios en determinados receptores celulares del hospedador, como son PAFr y PSGL-1, que participan de un modo muy significativo en la interacción y/o eliminación de este microorganismo. Además, el análisis genómico

de LytA y Pce sugiere que el HT no produce cambios que modifiquen, al menos directamente, la actividad específica descrita para estas proteínas. Sin embargo, ha revelado la existencia de un gran polimorfismo en la proteína Pce

## REFERENCIAS:

- Ardanuy, C., de la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A., Calatayud, L., Cercenado, E., Pérez-Trallero, E., Bouza, E., y Liñares, J. (2014). Spread of *Streptococcus pneumoniae* serotype 8-ST63 multidrug-resistant recombinant Clone, Spain. *Emerg Infect Dis.* **20**: 1848-1856.
- Bogaert, D., De Groot, R., y Hermans, P.W. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis.* **4**: 144-154.
- Brueggemann, A.B., Pai, R., Crook, D.W., y Beall, B. (2007). Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog.* **3**: e168.
- Coffey, T.J., Dowson, C.G., Daniels, M., Zhou, J., Martín, C., Spratt, B.G., y Musser, J.M. (1991). Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **5**: 2255-2260.
- Domenech, A., Ardanuy, C., Balsalobre, L., Martí, S., Calatayud, L., De la Campa, A.G., Brueggemann, A.B., y Liñares, J. (2012). Pneumococci can persistently colonize adult patients with chronic respiratory disease. *J Clin Microbiol.* **50**: 4047-4053.
- Domenech, A., Ardanuy, C., Calatayud, L., Santos, S., Tubau, F., Grau, I., Verdaguer, R., Dorca, J., Pallarés, R., Martín, R., et al. (2011). Serotypes and genotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing pneumonia and acute exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Antimicrob Chemother* **66**: 487-493.
- Feikin, D.R., Kagucia, E.W., Loo, J.D., Link-Gelles, R., Puhan, M.A., Cherian, T., Levine, O.S., Whitney, C.G., O'Brien, K.L., y Moore, M.R. (2013). Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate vaccine introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med.* **10**: e1001517.
- Golubchik, T., Brueggemann, A.B., Street, T., Gertz, R.E., Jr., Spencer, C.C., Ho, T., Giannoulidou, E., Link-Gelles, R., Harding, R.M., Beall, B., et al. (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a vaccine escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nat Genet.* **44**: 352-355.
- Hergott, C.B., Roche, A.M., Naidu, N.A., Mesaros, C., Blair, I.A., y Weiser, J.N. (2015). Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. *J Clin Invest.* **125**: 3878-3890.
- Hermoso, J.A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., y Menéndez, M. (2005). Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat Struct Mol Biol.* **12**: 533-538.
- Jauneikaite, E., Tocheva, A.S., Jefferies, J.M., Gladstone, R.A., Faust, S.N., Christodoulides, M., Hibberd, M.L., y Clarke, S.C. (2015). Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods.* **113**: 41-49.
- 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.
- Koedel, U., Scheld, W.M., y Pfister, H.W. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis.* **2**: 721-736.
- 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.
- 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.
- Morales, M., Martín-Galiano, A.J., Domenech, M., y García, E. (2015). Insights into the evolutionary relationships of LytA autolysin and Ply pneumolysin-like genes in *Streptococcus pneumoniae* and related streptococci. *Genome Biol Evol.* **7**: 2747-2761.
- Morens, D.M., Folkers, G.K., y Fauci, A.S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* **430**: 242-249.
- Mutepe, N.D., Cockeran, R., Steel, H.C., Theron, A.J., Mitchell, T.J., Feldman, C., y Anderson, R. (2013). Effects of cigarette smoke condensate on pneumococcal biofilm formation and pneumolysin. *European Respir J* **41**: 392-395.
- Nadigel, J., Prefontaine, D., Baglolle, C.J., Maltais, F., Bourbeau, J., Eidelman, D.H., y Hamid, Q. (2011). Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8<sup>+</sup> T cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* **12**: 149.
- O'Brien, K.L., y Levine, O.S. (2006). Effectiveness of pneumococcal conjugate vaccine. *Lancet.* **368**: 1469-1470.
- OMS (2016). Neumonía. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/>.

- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., Campuzano, S., Moscoso, M., González-Camacho, F., Domenech, M., Rodríguez de Córdoba, S., Sánchez-Madrid, F., Brown, J.S., García, E., *et al.* (2015). Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infection and immunity*. **83**: 591-603.
- Sethi, S., y Murphy, T.F. (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. **359**: 2355-2365.
- Shukla, S.D., Sohal, S.S., Mahmood, M.Q., Reid, D., Muller, H.K., y Walters, E.H. (2014). Airway epithelial platelet-activating factor receptor expression is markedly upregulated in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **9**: 853-861.
- UNICEF (2015). UNICEF global databases 2015. <http://data.unicef.org/child-health/pneumonia.html>.
- UNICEF y WHO (2006). Pneumonia: the forgotten killer of children. [http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia\\_The\\_Forgotten\\_Killer\\_of\\_Children.pdf](http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf)
- van der Poll, T., y Opal, S.M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet* **374**: 1543-1556.



## **I.INTRODUCCIÓN**



## 1. GENERALIDADES DE *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

### 1.1. Aspectos históricos

*Streptococcus pneumoniae* fue descubierto, de manera independiente y casi simultánea, en 1881 por dos microbiólogos, George M. Sternberg en Estados Unidos y Louis Pasteur en Francia. Ambos describieron vagamente la existencia de bacterias cocoides con forma lanceolada en la saliva humana. Pasteur y Sternberg inyectaron saliva humana en conejos, pero de un modo diferente, ya que Pasteur usó saliva de un niño muerto por la rabia, mientras que Sternberg usó su propia saliva, aislando así los dos investigadores diplococos en la sangre de estos animales (Bajic *et al.*, 2015; Pasteur, 1881; Sternberg, 1881). Previamente, en la literatura ya se habían identificado diplococos elongados, pero sólo Sternberg y Pasteur demostraron el potencial patogénico de esta bacteria. Desde entonces, este microorganismo ha recibido diversos nombres. En 1886, Fraenkel lo denominó *Pneumococcus*, por su capacidad de producir enfermedades pulmonares (Fraenkel, 1886). Se renombró como *Diplococcus pneumoniae*, en 1920, debido a los pares de cocos que causaban estas enfermedades. Este epíteto ya había sido sugerido por Weichselbaum, en 1886, en una serie de artículos referidos al agente causante conocido por entonces como *croupous pneumonia* o *kapsel kokken* (Watson *et al.*, 1993). Sin embargo, no fue hasta 1901 cuando recibió el nombre actual, *Streptococcus pneumoniae*, debido a su característica forma de crecer en forma de cadenas en medio líquido. No obstante, debe hacerse notar que esta última denominación no fue aceptada oficialmente hasta 1980 (Skerman *et al.*, 1980) y que, hoy en día, también es comúnmente referido como neumococo. Durante los años 80 del siglo XIX, Christian Gram desarrolló la tinción que lleva su nombre, con el fin de observar la bacteria en el tejido pulmonar de pacientes muertos por neumonía. Esta tinción permitió catalogar a esta bacteria como Gram-positiva, siendo aún hoy en día una de las herramientas bacteriológicas más empleada.

Neumococo ha desempeñado un papel fundamental en el nacimiento de la biología molecular, demostrando que el material genético se compone de DNA (López, 2006). Después de la temprana descripción del papel de neumococo en la enfermedad, Klemperer y Klemperer (citado por Austrian, 1981) demostraron que el suero de conejos infectados con bacterias inactivadas por calor o con filtrado del medio de cultivo contenían factores que conferían inmunidad frente a reinfecciones con el mismo aislado bacteriano pero no necesariamente frente a infecciones con otros aislados clínicos del mismo microorganismo y, lo que es más importante, demostraron que los conejos estaban protegidos frente a la infección por neumococo, si eran inyectados con suero procedente de animales previamente inmunizados. En los años veinte del pasado siglo se demostró que el polisacárido capsular (CPS) era el responsable de la actividad inmunológica de neumococo y, además, que confería una protección cepa-específica en ratones, convirtiéndose en el primer antígeno no proteico identificado (Heidelberger y Avery, 1923, 1924; Heidelberger *et al.*, 1925). En 1928, el científico británico Frederick Griffith obtuvo la primera evidencia de transformación genética bacteriana trabajando con *S. pneumoniae*. Griffith, que estudiaba la relación entre la capsula polisacáridica y la patogenidad de la bacteria, descubrió el "principio transformante". Demostró que la inoculación simultánea de bacterias capsuladas, denominadas por él como lisas o "S" (del inglés *smooth*) y, por tanto, virulentas, pero inactivadas por calor junto con bacterias no capsuladas vivas, rugosas o "R" (*rough*), no virulentas de por sí, producía una

infección mortal en los ratones, siendo las bacterias recuperadas de tipo capsulado (Griffith, 1928). Griffith no pudo entender el significado de su descubrimiento en ese momento y no fue hasta 1944 cuando Avery, McLeod, y McCarty, usando el mayor factor de virulencia de neumococo, el polisacárido capsular, demostraron que el DNA, y no otras moléculas, constituía el material genético responsable del cambio fenotípico observado en los procesos de transformación (Avery *et al.*, 1944; McCarty y Avery, 1946).

### 1.2. Características generales

*S. pneumoniae* es un microorganismo patógeno capaz de causar diversas infecciones y procesos invasivos severos. Se trata de una bacteria Gram-positiva de 0.5–1.0  $\mu\text{m}$  de longitud que presenta una forma oval con los extremos distales lanceolado. Es inmóvil, no forma endosporas, y es un miembro  $\alpha$ -hemolítico del género *Streptococcus*. Generalmente, se presenta en forma de diplococo, aunque existen algunos factores que pueden inducir la formación de cadenas. Cuando se cultiva en placas de agar-sangre en aerobiosis presenta una marcada  $\alpha$ -hemólisis debido a la producción de peróxido de hidrógeno (Barnard y Stinson, 1996) pero, si es incubado en anaerobiosis se observa  $\beta$ -hemólisis debida a la acción de la neumolisina (Ply) (Brzin, 1969). Metabólicamente hablando, neumococo es un microorganismo microaerófilo, catalasa-negativo, que se encuentra dentro del grupo de las bacterias del ácido láctico, ya que este compuesto es el principal producto resultante de la fermentación de carbohidratos. *S. pneumoniae* es una bacteria auxótrofa para la colina (Rane y Subbarow, 1940a; Rane y Subbarow, 1940b) siendo este aminoalcohol, en forma de fosforilcolina (PCho), un componente estructural de los ácidos teicoicos (TAs) de pared (WTA) y lipoteicoicos (LTA) (Briles y Tomasz, 1973; Brundish y Baddiley, 1968; Gisch *et al.*, 2013; Tomasz, 1967). En cuanto al genoma de neumococo, tiene una longitud media de 2.1 millones de pares de bases (Mpb) con un contenido en G+C de, aproximadamente, 40% (Donati *et al.*, 2010).

De manera característica, neumococo se lisa rápidamente en presencia de sales biliares como el desoxicolato sódico (Doc) (Avery y Cullen, 1923; Neufeld, 1902), el cual dispara la acción incontrolada de la principal autolisina de neumococo, LytA (*N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa o NAM-amidasa), que degrada la pared en un proceso totalmente dependiente de colina (García *et al.*, 1985; Høltje y Tomasz, 1975; Mosser y Tomasz, 1970). Este patrón de susceptibilidad a Doc se utiliza en la identificación del microorganismo. Otros métodos diagnósticos de identificación de neumococo en el laboratorio clínico son la sensibilidad a la optoquina (Opt) (Lund y Henrichsen, 1978) y la reacción capsular en presencia de anticuerpos o reacción de Quellung (Neufeld, 1902). Opt, 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 protónmotriz ( $H^+$ -ATPasa) de neumococo (Fenoll *et al.*, 1994). Aunque neumococo es generalmente susceptible a Opt, existen cepas Opt-resistentes de *S. pneumoniae*, así como estreptococos filogenéticamente muy próximos a neumococo —los denominados estreptococos del grupo mitis o SGM— que pueden ser susceptibles a la acción de este compuesto (de la Campa *et al.*, 1997; Balsalobre *et al.*, 2006; Martín-Galiano *et al.*, 2003). Es por esto por lo que la identificación de neumococo es más fiable si las pruebas antes mencionadas se realizan conjuntamente (Lund y Henrichsen, 1978).

### 1.3. Importancia clínica

*S. pneumoniae* es un microorganismo patógeno casi exclusivamente humano (Denapaitte y Hakenbeck, 2011), responsable de un gran espectro de enfermedades infecciosas y procesos invasivos. Las infecciones neumocócicas son una importante causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. Neumococo produce desde patologías relativamente leves, como son la otitis media y la conjuntivitis, a enfermedades más severas, como la neumonía invasiva, la septicemia y la meningitis. Neumococo reside de manera natural en la superficie de las mucosas del tracto respiratorio superior. Debido, posiblemente, a su conocida capacidad de formación de biofilmes (Domenech *et al.*, 2012), *S. pneumoniae* es portado de manera asintomática en la nasofaringe de un gran número de niños (20–40%) y, en menor proporción, de adultos (5–10%). La colonización del tracto respiratorio superior tiene lugar poco después del nacimiento (Austrian, 1986; Weiser, 2010) y es conocida como estado de portador. Las enfermedades infecciosas se producen cuando la bacteria gana acceso a áreas generalmente estériles de las vías respiratorias (Kadioglu *et al.*, 2008) produciéndose así la diseminación, colonización e invasión de neumococo, principalmente, del oído medio (produciendo otitis media), los pulmones (neumonía), el torrente sanguíneo (septicemia) o el sistema nervioso central. Las infecciones bacteriémicas, las cuales están asociadas con una mayor mortalidad y morbilidad, tienen lugar, generalmente, por complicaciones de una neumonía. La diseminación entre diferentes individuos ocurre por contacto directo con secreciones de personas colonizadas. La colonización, como se ha señalado, es más frecuente en la población infantil; la mayoría de los niños adquieren una o varias cepas consecutivamente o simultáneamente (Kadioglu *et al.*, 2008). No obstante, la aparición de síntomas clínicos viene determinada por ciertos factores de interacción entre el hospedador y la bacteria, como es el serotipo capsular (Weinberger *et al.*, 2010). La tasa de incidencia de las diferentes infecciones varía entre los más de 95 serotipos capsulares conocidos (Jauneikaite *et al.*, 2015), lo que se debe a la existencia de diferencias antigénicas y estructurales entre los CPS. Así, las cepas de neumococo de los serotipos 3, 6B o 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 que, con más frecuencia, causan enfermedad invasiva en niños (Henriques *et al.*, 2000).

Se calcula que la tercera parte de las muertes anuales que se producen en el mundo son debidas a enfermedades infecciosas y, entre todas ellas, las respiratorias son las responsables del fallecimiento de 4 millones de personas cada año (Morens *et al.*, 2004). De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la sepsis, la neumonía neonatal y la comunitaria en niños dieron cuenta del 15% de las casi un millón de muertes anuales en niños menores de 5 años ocurridas en 2015, siendo *S. pneumoniae* el causante más frecuente de neumonía infantil severa tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo (OMS, 2016; UNICEF, 2015; UNICEF y WHO, 2006). En los países desarrollados, la morbilidad y mortalidad relacionadas con esta bacteria han cambiado muy poco desde el primer aislamiento del patógeno. Además, cada año se producen casi 15 millones de casos graves de enfermedad neumocócica en la población infantil (O'Brien *et al.*, 2009). Por otra parte, algunos cálculos indican que los costes, directos e indirectos, producidos como consecuencia de las infecciones neumocócicas en personas de edad avanzada en EE.UU. pueden superar los 5000 millones de dólares anuales (Weycker *et al.*, 2010) y 109 millones el tratamiento de los niños enfermos de neumonía en 66 de los “países de la cuenta regresiva para 2015 con respecto a la supervivencia

materna, neonatal e infantil” (OMS, 2016). La incidencia de la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) varía geográficamente, estando altamente ligada a factores relacionados con la pobreza (UNICEF y WHO, 2006) y, como ya se ha mencionado, con ciertos grupos de edad. Su prevalencia es mayor en África subsahariana y Asia meridional y presenta una tasa de incidencia más elevada en niños menores de 2 años, seguida de los adultos mayores de 65. Aunque la enfermedad neumocócica es más frecuente en niños, su letalidad en ancianos es superior (20–40%), a pesar del tratamiento antibiótico adecuado (WHO, 2008).

### **1.4. Factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad neumocócica**

La mayor incidencia en la población pediátrica se debe a que el sistema inmune infantil no está completamente desarrollado y tiene una menor capacidad para responder a los antígenos polisacáridicos, lo que se manifiesta en una mayor vulnerabilidad a determinadas infecciones bacterianas. Además, la colonización y adquisición de nuevas cepas de neumococo es más frecuente en este sector de la población, lo cual podría contribuir a la alta incidencia de la enfermedad en dicha población (Hussain *et al.*, 2005). Aparte de la edad, otro factor que influye en la aparición de síntomas de infección neumocócica es el estado inmunológico. Así, las personas con ciertas enfermedades de base o infectadas previamente por otros agentes respiratorios, como el virus de la gripe (McCullers, 2006; Wang *et al.*, 2011), tienen un mayor riesgo de padecer formas más graves de la enfermedad, siendo el principal grupo de riesgo los individuos con inmunodeficiencias de cualquier tipo. Neumococo, además, puede afectar a personas inmunocompetentes con ciertas enfermedades que requieren de cuidados médicos continuados (CDC, 1997). En este último grupo se incluyen los pacientes con afecciones crónicas cardiovasculares, hepáticas, renales, metabólicas o respiratorias, como son los que sufren enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). El tabaquismo es también un factor de riesgo importante en la ENI (Campins Martí, 2015).

### **1.5. Prevención de la enfermedad neumocócica**

En la última década se han realizado importantes progresos en la prevención de estas infecciones. Hasta hace pocos años sólo se disponía de una vacuna antineumocócica no conjugada 23-valente (PPSV23), compuesta por una mezcla de 23 CPSs de los serotipos responsables de la mayoría de las infecciones causadas por esta bacteria (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F), eficaz únicamente a partir de los 2 años de edad y sin capacidad de producir memoria inmunitaria. Los CPSs estimulan la actividad de las células B, por lo que inducen una respuesta inmune independiente de linfocitos T. Desde el año 2000 se dispone, además, de vacunas conjugadas, que pueden administrarse desde los 2 meses de edad, con un alto perfil de eficacia y seguridad. Estas vacunas se basan en la conjugación de los CPSs de los serotipos responsables de la mayoría de los casos de ENI infantil en EE.UU. a un componente proteico (toxóide diftérico), capaz de estimular la respuesta mediada por linfocitos T y, por tanto, producir memoria inmunológica (American Academy of Pediatrics, 2000). En el año 2001 se desarrolló la vacuna conjugada 7-valente (PCV7) formada por los CPSs de los serotipos 4, 6B, 19F, 23F, 18C, 14 y 9V. Desde 2010 hasta la actualidad se administran, tanto a niños como a adultos, las vacunas conjugadas

10-valente (PCV10) y 13-valente (PCV13). Éstas últimas incluyen, adicionalmente, CPSs de los serotipos 1, 5 y 7F (PCV10) y 3, 6A, 6B y 19A (PCV13) (Paradiso, 2011, 2012). Sin embargo, las vacunas conjugadas también tienen aspectos negativos, entre los cuales destacan el limitado número de serotipos frente a los que protege, el alto coste de cada dosis y el fenómeno conocido como “reemplazo de serotipo” (*capsular switching*) por serotipos no presentes en la vacuna, que causan enfermedad y que se está produciendo como consecuencia de la introducción de estas vacunas conjugadas (Weinberger *et al.*, 2011). Algunos serotipos de neumococo, como son el 1 y el 7F, presentan baja diversidad genética, es decir, están fuertemente asociados con un genotipo dominante, definido por la tipificación mediante secuenciación multilócica (en inglés *Multilocus sequence typing*; MLST). Sin embargo, otros, como es el CPS del serotipo 19A, se expresan por una gran variedad de genotipos que muestran variación geográfica y temporal (Ardanuy *et al.*, 2009; Brueggemann y Spratt, 2003; Tarragó *et al.*, 2011). Esto es importante en términos de diseminación debido a que el cambio de genes capsulares por transformación permite a los aislados de neumococo de ciertos genotipos la posibilidad de expresar diferentes tipos capsulares (Coffey *et al.*, 1991). Tras la implantación de la vacuna PCV7 en España se ha observado un incremento evidente del reemplazo de serotipos, lo cual supone una seria amenaza dado que esto permite a los clones preexistentes, que expresaban los serotipos incluidos en la PCV7, escapar de la inmunidad inducida por la vacunación gracias a la adquisición de genes capsulares que codifican polisacáridos capsulares no incluidos en la vacuna (Brueggemann *et al.*, 2007; Golubchik *et al.*, 2012).

## 1.6. Tratamiento y resistencias

Un problema adicional en la infección neumocócica es la aparición de aislados clínicos resistentes a los antibióticos. Para el tratamiento de neumococo en todas las localizaciones se emplean los antibióticos  $\beta$ -lactámicos como línea de primera actuación. Otras opciones empleadas son las fluoroquinolonas y los macrólidos. Desde que fueron descritos los primeros casos de neumococos resistentes a penicilina en la década de los sesenta del pasado siglo (Hansman y Bullen, 1967; Kislak *et al.*, 1965), esta resistencia ha ido expandiéndose a muchos países, incluido el nuestro, dando lugar a la aparición de resistencias no sólo a fluoroquinolonas y macrólidos (Balsalobre *et al.*, 2003; Low, 2005), sino también a otros antibióticos menos habituales, así como a la aparición de cepas multirresistentes.

Dentro de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos destacan la amoxicilina (AMX), como miembro más utilizado del grupo de las penicilinas, así como la cefotaxima (CTX) y la ceftriaxona (CRO), dentro del grupo de las cefalosporinas, por su amplia utilización en el tratamiento parenteral de la ENI a nivel hospitalario. Dentro del grupo de las cefalosporinas, una de las alternativas por vía oral —aunque también puede administrarse por vía parenteral— es el cefditoren (CDN), que presenta una buena actividad frente a neumococo (Yamada *et al.*, 2007). *S. pneumoniae* es uno de los pocos patógenos en los que no se ha descrito la presencia de  $\beta$ -lactamasas, sino que la resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se debe a modificaciones en las proteínas de unión a penicilina (PBPs, del inglés *penicillin-binding proteins*). Neumococo posee cinco PBPs de alto peso molecular (1a, 1b, 2a, 2b y 2x) y una de bajo peso molecular (PBP3) que no parece implicada en el mecanismo de muerte inducido por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Las PBPs alteradas se encuentran codificadas por genes mosaico que han surgido por procesos de

recombinación entre los genes *pbp* de neumococo y sus homólogos de otras especies de estreptococos relacionadas filogenéticamente (Coffey *et al.*, 1995). La recombinación parece ser un mecanismo esencial en la evolución de las resistencias a estos antibióticos en la naturaleza, y la resultante propagación clonal de estas cepas desempeña un papel fundamental en el incremento global de la resistencia a  $\beta$ -lactámicos (McGee *et al.*, 2001). Por similitud estructural, estos antibióticos inhiben el crecimiento de neumococo inactivando la síntesis de las PBP de la pared celular. Las alteraciones, principalmente, en las PBP1A, PBP2B y PBP2X, son las responsables de la reducción de la afinidad tanto para las penicilinas como para otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Coffey *et al.*, 1995). Los altos niveles de resistencia a cefalosporinas de tercera generación ocurren por modificaciones en PBP1A y PBP2X, mientras que los altos niveles de resistencia a penicilina requieren también alteraciones en PBP2b (Coffey *et al.*, 1995). Además, se ha descrito que tanto *pbp1a* como *pbp2x* están localizados flanqueando al locus capsular dando lugar, en ciertas ocasiones, a que los fragmentos de recombinación también incluyan parte o todo el gen *pbp1a* o *pbp2x*, lo cual conlleva la adquisición de un nuevo CPS junto con nuevos genes *pbp* (Ardanuy *et al.*, 2014).

### 1.7. Tipificación y genes capsulares

Hoy en día, debido a la gran incidencia de neumococo como patógeno humano, el incremento de cepas con alto grado de resistencia antibiótica y cepas multirresistentes, así como la necesidad de encontrar una vacuna eficaz, basada en proteínas de la bacteria que sean comunes a todos o a la mayoría de aislados clínicos, que posean un alto grado de conservación y que confieran inmunidad ha llevado a que los estudios epidemiológicos sobre esta bacteria adquieran un gran interés. Hasta 1998, la técnica más común para la tipificación de *S. pneumoniae* era la serotipificación mediante la reacción capsular o reacción de Quellung, que consiste en la determinación del tipo capsular mediante la utilización de anticuerpos específicos frente el CPS (Neufeld, 1902). Esta técnica se sigue empleando con tecnologías que permiten simplificar el procedimiento (Fenoll *et al.*, 1997; Marimón *et al.*, 2010).

La cápsula de neumococo es el principal factor de patogenicidad y su composición antigénica es variable en las diferentes cepas, lo cual le permite eludir la acción fagocitaria en ausencia de anticuerpos específicos (Hyams *et al.*, 2010). Aunque la producción de la cápsula es indispensable para la virulencia de la bacteria, se han descrito aislados de neumococo no tipificables (previsiblemente carentes de CPS) que causan frecuentes brotes de conjuntivitis (Crum *et al.*, 2004; Martín *et al.*, 2003; Patel *et al.*, 2007; Porat *et al.*, 2006), así como casos aislados de conjuntivitis (Haas *et al.*, 2011) u otitis media (Xu *et al.*, 2004). La cápsula está formada por polisacáridos complejos que, a su vez, están compuestos por unidades repetidas de azúcares (Kamerling, 2000). En la mayoría de los casos estos polisacáridos se encuentran unidos covalentemente al peptidoglicano o a componentes de la membrana que, a veces, pueden liberarse de la célula (Eberhardt *et al.*, 2012; Yother, 2011).

En la actualidad se han descrito más de 96 serotipos capsulares inmunológicamente diferentes (Jauneikaite *et al.*, 2015), 90 de los cuales ya fueron descritos hasta 1995 (Henrichsen, 1995) y los restantes han sido encontrados los últimos años, concretamente han sido los serotipos 6C (Bratcher *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2007a; Park *et al.*, 2007b), 6D (Bratcher *et al.*, 2010), 6F y 6G (Oliver *et al.*, 2013); el 11E (Calix y Nahm, 2010; Zartler *et al.*, 2009), los serotipos 20A y 20B

(Calix *et al.*, 2012) y el posible serotipo 6E (Ko *et al.*, 2013). El locus responsable de la biosíntesis del CPS es el locus *cap* (o *cps*) y se localiza en la misma región del cromosoma en todos los serotipos, entre *dexB* y *aliA*, con la única excepción del serotipo 37, en el cual la síntesis del CPS depende del gen *tts* situado lejos del locus *cap* en el cromosoma de *S. pneumoniae* (Llull *et al.*, 1999). La regulación genética de la cápsula es compleja, de manera que algunas cepas pueden experimentar una transformación o cambio de serotipo. Aunque la serotipificación siempre será importante para distinguir aislados de neumococo y evaluar el impacto de las vacunas disponibles, el hecho de que sólo una fracción de los aislados que expresan el mismo serotipo sean capaces de desarrollar resistencia a los antimicrobianos hizo necesario el desarrollo de técnicas que permitiesen distinguir entre aislados de un mismo serotipo (McGee *et al.*, 2001). Así, se desarrollaron técnicas adicionales como la electroforesis de DNA genómico en campo pulsante (PFGE) (Gasc *et al.*, 1991; Lefevre *et al.*, 1993) y, más tarde, la técnica de MLST. La técnica de PFGE se basa, generalmente, en la comparación visual de los perfiles resultantes de la digestión del genoma completo. La diferenciación de los clones se establece mediante reglas arbitrarias definidas, o mediante puntos de corte definidos por programas informáticos. Sin embargo, la técnica de MLST se basa en los mismos principios que la electroforesis multienzimática (*Multilocus enzyme electrophoresis*) (Hall *et al.*, 1996; Selander *et al.*, 1986), pero se diferencia de ésta esencialmente en que lo que se compara son las secuencias parciales de siete genes muy conservados (genes *housekeeping*), en lugar de la movilidad electroforética de diversas enzimas. 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 (BD) en Internet (<http://spneumoniae.mlst.net/>) (Enright y Spratt, 1999). 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 BD y el conjunto de dichos números se denomina secuencitipo (ST; *sequence type*). Un total de 12 931 STs se encuentran incluidos en la BD (último acceso, 20 de enero de 2017). Todos los aislados de neumococo 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).

Se ha descrito que existen 16 métodos de tipificación de neumococo donde, además, de los ya comentados existe la determinación de las resistencias antimicrobianas, la tipificación de la proteína A de superficie (PspA), así como distintas pruebas moleculares semiautomáticas y la identificación directa a partir del análisis del genoma completo (Jauneikaite *et al.*, 2015).

## 1.8. Pared celular

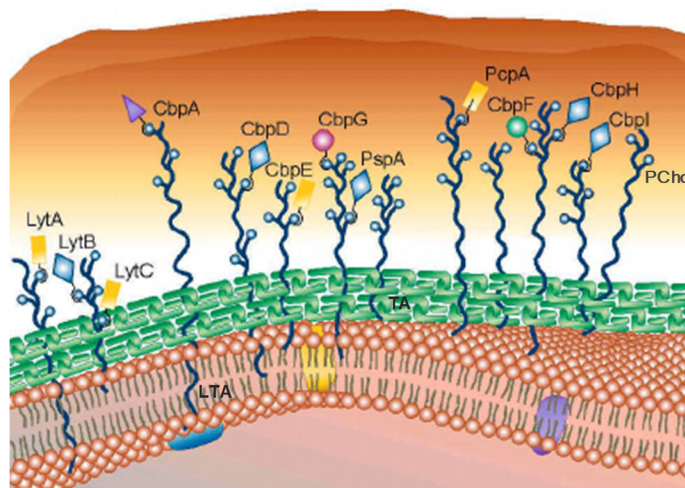
### 1.8.1. Importancia de la fosforilcolina (PCho)

Bajo la cápsula polisacáridica se encuentra la pared celular, una estructura dinámica y compleja, compuesta por múltiples capas de un polímero denominado peptidoglicano, el cual contiene

unidades de TAs que se disponen de dos formas en la pared celular, bien unidos covalentemente a la pared (WTA o polisacárido C) o a los lípidos de la membrana (LTA, o antígeno-F) (Denapaité *et al.*, 2012; Gisch *et al.*, 2013; Seo *et al.*, 2008; Skov Sorensen *et al.*, 1988). La estructura del peptidoglicano consiste en un entramado tridimensional de cadenas glicánicas constituidas por residuos alternados de ácido *N*-acetilmurámico (MurNAc) y *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc) unidos mediante enlaces glicosídicos  $\beta(1\rightarrow4)$  que se entrecruzan mediante cortos segmentos peptídicos (Weidel y Pelzer, 1964). Los TAs, descritos por primera vez en 1930 bajo la denominación de polisacárido C debido a su interacción con la proteína C-reactiva (CRP) humana (Tillett *et al.*, 1930), se incorporan al peptidoglicano durante la formación de la pared celular y están formados, en general, por un número variable de repeticiones —entre 4 y 8— de un pentasacárido. Con la excepción de algunas cepas, todas las repeticiones contienen dos residuos de *N*-acetil-galactopiranososa (GalpNAc) que presentan el sustituyente PCho en posición 6, a excepción de la repetición terminal que puede o no contenerlo (Gisch *et al.*, 2015). Una de las características más notables de la pared de neumococo es la presencia de residuos de PCho unidos covalentemente a los WTAs y LTAs, los cuales están involucrados en muy diversas funciones fisiológicas (Fischer, 2000; Hakenbeck *et al.*, 2009). Existen dos variantes químicas diferentes de este aminoalcohol, una libre y otra generalmente unida a proteínas. Entre sus funciones cabe destacar que los residuos de PCho son reconocidos por la CRP (Volanakis y Kaplan, 1971), la proteína amiloide del suero (SAP) (Yuste *et al.*, 2007) y la  $\mathbb{L}$ -ficolina (Vassal-Stermann *et al.*, 2014), tres elementos del sistema inmune que inducen a la activación del complemento, promoviendo la protección del hospedador frente a las infecciones. Además, la unión de la PCho presente en la bacteria al receptor del factor activador plaquetario (PAFr) promueve la adhesión a las células del hospedador (Cundell *et al.*, 1995). Se ha descrito que los aislados de neumococo que no poseen PCho son incapaces de colonizar el tracto respiratorio superior en ratones y son menos virulentos en modelos murinos de sepsis (Kharat y Tomasz, 2006). Los residuos de PCho presentes en la pared celular constituyen ligandos específicos de unión para proteínas de superficie, como son las llamadas proteínas de unión a colina o CBPs (Fig. 1), y, también, los WTAs, a través de los residuos de PCho, forman parte de los receptores del bacteriófago Dp-1 (López *et al.*, 1982).

*S. pneumoniae*, como ya se ha mencionado, no es capaz de sintetizar la colina y es dependiente de ella para su crecimiento (Rane y Subbarow, 1940b). No obstante, neumococo es capaz de multiplicarse en ausencia de colina cuando hay presente en el medio un análogo estructural de la misma, como la etanolamina, pero la bacteria bajo estas condiciones forma largas cadenas y es incapaz de autolisarse o llevar a cabo procesos de transformación (Tomasz, 1968; Ware *et al.*, 2005). Cuando posee colina en el medio, ésta es transportada al interior de la célula, transformada a PCho e incorporada a los TAs (Weiser *et al.*, 1989). Los genes de neumococo implicados en el metabolismo de la colina y de los TAs se encuentran agrupados en una región específica del genoma que es conocida como región *lic* (*lipo-polysaccharide core*). Estos genes fueron localizados por homología con los responsables del metabolismo de la colina en *Haemophilus influenzae* (Serino y Virji, 2000; Weiser *et al.*, 1989; Weiser *et al.*, 1997). En *S. pneumoniae*, esta región presenta tres marcos de lectura abiertos (ORFs) adicionales con respecto a dicha región en *H. influenzae* y está compuesto por, al menos, dos operones que se transcriben de manera divergente (Kharat y Tomasz, 2006) dando lugar a los operones *lic1* y *lic2*. El operón *lic1* contiene los genes *tarI*, *tarJ*, *licA*, *licB* y *licC* (Baur *et al.*, 2009; Kharat y

Tomasz, 2006). Por su parte, el operón *lic2* está compuesto por los genes *tacF*, *licD1* y *licD2* (Damjanovic *et al.*, 2007; Kharat y Tomasz, 2006; Zhang *et al.*, 1999). Las proteínas codificadas llevan a cabo el metabolismo de la PCho. En primer lugar, la colina es captada del medio exterior por el transportador LicB. A continuación, la quinasa LicA lleva a cabo la fosforilación de la colina en el citoplasma celular para dar lugar a la PCho (Eberhardt *et al.*, 2009), la cual es posteriormente activada a CDP-colina por la acción de la CTP:fosforilcolina citidililtransferasa, donde participa LicC (Kwak *et al.*, 2002). Las transferasas LicD1 y LicD2 catalizan el transporte del motivo de PCho desde su forma de CDP-colina al precursor de los TAs, el ribitol-fosfato, siendo así responsables de la unión de la colina a los TAs. Las proteínas codificadas por los genes *tarJ* y *tarI*, a su vez, parecen estar relacionadas con la síntesis de dicho precursor (Baur *et al.*, 2009). El gen denominado *tacF* codifica el transportador TacF (*teichoic acid flippase*). Esta proteína es la responsable de traslocar finalmente las subunidades (o las cadenas poliméricas de TA) desde el citoplasma bacteriano hacia la pared celular, donde la PCho es integrada (Damjanovic *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015).



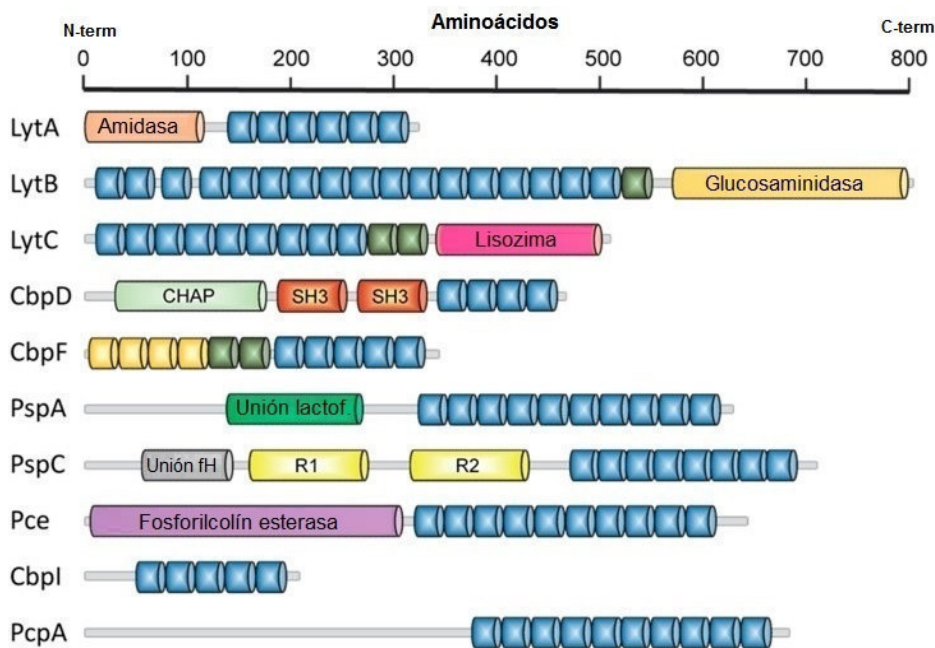
**Fig. 1. Representación de la pared celular de neumococo y algunas proteínas de unión a colina (CBPs).** Se muestran 12 CBPs unidas por un dominio de unión conservado a los residuos de colina presentes en los ácidos teicoicos (TA) y lipoteicoicos (LTA) (círculos azules en las estructuras alargadas azules oscuras), que, a su vez, se encuentran ancladas al peptidoglicano (verde) o a la membrana plasmática. CbpE, se denomina también LytD y Pce. CbpA se denomina también PspC, SpsA y PbcA. Modificada de McCullers y Tuomanen, 2001.

La presencia de colina como componente estructural de la pared celular, se ha considerado durante mucho tiempo como una característica específica de *S. pneumoniae* (Tomasz, 1967). Sin embargo, hace unos años se publicó que también estaba presente en las estructuras periféricas de otros patógenos del tracto respiratorio (Clark y Weiser, 2013; Weiser *et al.*, 1998a; Weiser *et al.*, 1998b). En la actualidad, existen numerosos trabajos que describen la presencia de colina en los TA de otros estreptococos comensales [para una revisión más amplia, véase García *et al.* (2000)]. Los microorganismos dependen de su persistencia en el hospedador, evadiendo o modulando las respuestas de éste a la infección. La PCho es usada para ambos procesos por un gran número de bacterias y parásitos. Aunque los mecanismos por los que éstos adquieren o expresan este compuesto son muy diversos, el denominador común de todos ellos

es la utilización de la PCho para reducir la respuesta inmune a las infecciones, creando así una ventaja evolutiva para los microorganismos que la expresan. Muchos de ellos han desarrollado mecanismos para variar la expresión y localización de este aminoalcohol. En neumococo, el 83% de la colina se encuentra formando parte de los WTAs (Yother *et al.*, 1998) y el 17% restante corresponde a los LTAs (Hakenbeck *et al.*, 2009).

#### 1.8.2. Características de las proteínas de unión a colina (CBPs)

La pared celular de neumococo contiene diversas proteínas de superficie, diferentes a las que participan en la síntesis de la propia pared celular. Se han identificado tres grupos de proteínas de superficie en neumococo: (1) alrededor de 50 lipoproteínas, (2) hasta 18 proteínas con un motivo LPXTG, que es la base para su unión covalente a través de una sortasa a la pared celular, y (3) hasta 16 proteínas de unión a colina o CBPs. Además, existe otro tipo de proteínas, que carecen de péptido señal con motivos de unión a la membrana, llamadas NCSP (*nonclassical surface proteins*). Las CBPs son proteínas que reconocen, específicamente, como sitio de anclaje los residuos de colina presentes en los WTAs y LTAs (Figs. 1 y 2); ello determina su localización en la superficie celular (Hakenbeck *et al.*, 2009). 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, en particular, en *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*. A pesar de que las CBPs de *S. pneumoniae* son muy diversas, todas poseen la capacidad de ocultar o impedir el reconocimiento por anticuerpos del epítipo PCho cuando se encuentran unidas a la pared celular (Sánchez-Puelles *et al.*, 1986; Yother *et al.*, 1982a). El número de CBPs de neumococo depende de la cepa bacteriana, pero parece variar entre, aproximadamente, 13 y 16. Con la posible excepción de CbpF (Molina *et al.*, 2009), las CBPs constan de, al menos, dos dominios diferentes, uno de unión a colina (CBD) —que le permite unirse de modo no covalente a los residuos de colina de la superficie de la bacteria— y uno o más dominios funcionales, responsable(s) de la actividad biológica en la proteína, ya sea ésta enzimática o no (López y García, 2004). Cada CBD está formado por un número variable de repeticiones (CBRs, repeticiones de unión a colina), pero siempre  $\geq 4$  repeticiones (García *et al.*, 1994) de unos 20 aminoácidos cada una, muchos de ellos aromáticos (PF01473) (García *et al.*, 1988) que se unen no covalentemente a la PCho (Sánchez-Beato *et al.*, 1998). En la mayoría de las CBPs (Fig. 2), el CBR se encuentra en el dominio C-terminal (con la excepción de LytB y LytC) y, a veces, es precedido por una secuencia rica en prolina como ocurre en PspA y PspC (Brooks-Walter *et al.*, 1999; Yother y White, 1994). De la cristalización del CBD en diferentes CBPs, como LytA (Fernández-Tornero *et al.*, 2002; Fernández-Tornero *et al.*, 2001), Pce (Hermoso *et al.*, 2005), CbpF (Molina *et al.*, 2009), Spr1274 (Zhang *et al.*, 2009) o LytC (Pérez-Dorado *et al.*, 2010), se sabe que el CBD se pliega formando una estructura en forma de horquilla que da lugar a una superhélice levógira con forma característica de solenoide. Con la notable excepción de LytA, CbpG y Cbpl, las demás CBPs de neumococo poseen un péptido señal que determina su localización en la superficie celular.



**Fig. 2. Representación de la organización modular de algunas CBPs de *S. pneumoniae*.** Las unidades en azul representan las repeticiones de unión a colina (CBRs) que configuran el dominio de unión a colina (CBD). Las regiones no consenso de las CBRs se representan en verde. Los módulos en amarillo representan las repeticiones que pertenecen a la familia denominada en la base de datos Pfam *CW\_binding\_1*, pero que no son capaces de unirse a colina. También se nombran las actividades asociadas a algunos módulos funcionales: CHAP, cisteína, amidohidrolasa histidina-dependiente/módulo peptidasa; Unión lactof, dominio de unión a lactoferrina; Unión fH, dominio de unión al factor H; R1 y R2, dominios con función de adhesina. Adaptada de Maestro y Sanz (2016), con permiso.

Una de las características de esta familia de proteínas, como ya se ha comentado anteriormente en esta Memoria, es su localización en la superficie bacteriana. Existe un 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 (Jedrzejas, 2006; Frolet *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2007; Mann *et al.*, 2006). 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 ENI (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Otras 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 (Ronda *et al.*, 1987; Sánchez-Puelles *et al.*, 1986) y la lisozima LytC (García *et al.*, 1999b) son las únicas dos autolisinas conocidas de neumococo pudiendo causar la lisis y consiguiente muerte de la bacteria.

LytA (Fig. 2) es la principal autolisina de neumococo, una NAM-amidasa, responsable de la típica lisis de neumococo al final de la fase estacionaria cuando es multiplica en medio líquido (Howard y Gooder, 1974). El gen *lytA* se encuentra altamente conservado, encontrando diversidad sólo en algunas secuencias (Gillespie *et al.*, 1997; Llull *et al.*, 2006). La región más significativamente polimórfica se encuentra alrededor de la posición 453 y, dependiendo de la secuencia precisa alrededor de este nucleótido, los alelos de *lytA* se pueden clasificar en dos familias (Fam\_A y Fam\_B) (Morales *et al.*, 2010). Su función *in vivo* está relacionada, por un

lado, con la virulencia mediada por la lisis celular, posiblemente, por la consecuente liberación de Ply al medio extracelular (Eldholm *et al.*, 2009; Martner *et al.*, 2008). Además, es parcialmente responsable de la intensa respuesta inflamatoria característica de la infección neumocócica al liberar componentes altamente proinflamatorios como fragmentos de la pared celular, WTAs y LTAs, tras la lisis bacteriana (Majcherczyk *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 1996; Moreillon y Majcherczyk, 2003). Se ha descrito que LytA contribuye a la lisis de neumococo inducida por ciertos antibióticos como la penicilina y la vancomicina, al igual que ocurre en presencia de Doc (Moreillon y Tomasz, 1988; Moscoso *et al.*, 2010; Tomasz *et al.*, 1970; Tomasz y Waks, 1975). También, la unión del factor C3b a la superficie bacteriana se incrementa notablemente en presencia de anticuerpos específicos y concentraciones subinhibitorias de macrólidos o antibióticos  $\beta$ -lactámicos en un proceso dependiente de la presencia de LytA (Ramos-Sevillano *et al.*, 2012). Por otro lado, recientemente se ha demostrado que esta proteína posee un papel importante en la neumonía bacteriémica y sepsis por un mecanismo independiente de la liberación de Ply (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). LytA es capaz de inhibir la activación del sistema del complemento por degradación directa con las moléculas de C3b unidas a la superficie bacteriana y por unirse a los reguladores negativos de complemento, factor H y C4BP (Angel *et al.*, 1994; Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Asimismo, se ha confirmado que la pérdida de LytA y Ply aumenta la eficiencia de los macrófagos alveolares para eliminar la bacteria y disminuye la capacidad de ésta para atravesar la barrera epitelial. LytA, también, es capaz de desintegrar con gran eficacia los biofilmes producidos por *S. pneumoniae in vitro* (Domenech *et al.*, 2012).

La otra autolisina de neumococo, LytC, posee una temperatura óptima de actividad enzimática en torno a los 30°C, lo cual sugiere que podría ser crucial en el tracto respiratorio superior (García *et al.*, 1999b) y, de hecho, la pérdida de función de LytC reduce significativamente la colonización nasofaríngea en ratas (Gosink *et al.*, 2000) y a células de nasofaringe humanas (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Esta CBP también participa en la formación de biofilmes (Moscoso *et al.*, 2006), pero su importancia destaca por su participación en el fratricidio celular (Claverys y Håvarstein, 2007) y su capacidad de disminuir el depósito de C3b en la superficie bacteriana y, por tanto, evadir el sistema del complemento y la fagocitosis (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011).

Por otro lado, LytB es una CBP con actividad *N*-acetilglucosaminidasa que desempeña un papel esencial en la separación de las células hijas (de las Rivas *et al.*, 2002; García *et al.*, 1999a). Se ha demostrado recientemente que, además de esta función y su derivada implicación en la diseminación celular y patogénesis, LytB participa directamente en la adhesión a células de nasofaringe humana. Además, está involucrada en el proceso de colonización nasofaríngea, evasión de la fagocitosis mediada por activación del complemento y en el establecimiento de la sepsis y neumonía (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Se ha observado que la inmunización de ratones con LytB induce la formación de anticuerpos protectores en modelos murinos de sepsis y neumonía invasiva, de modo que esta enzima podría ser una buena candidata para el desarrollo de vacunas proteicas frente a *S. pneumoniae* (Corsini *et al.*, 2016). Esta proteína, también, es importante en la formación de biofilmes (Domenech *et al.*, 2013; Moscoso *et al.*, 2006).

CbpD es una mureín-hidrolasa, exclusiva de la fase de competencia, que participa en el proceso de fratricidio junto con LytA y LytC (Guiral *et al.*, 2005) y posee actividad autolítica que actúa en la zona de división celular (Eldholm *et al.*, 2009; Eldholm *et al.*, 2010).

La fosforilcolín esterasa Pce (Fig. 2), también denominada CbpE y LytD, cataliza la hidrólisis de alrededor del 20% de los residuos de PCho de los WTAs (de las Rivas *et al.*, 2001; Hermoso *et al.*, 2005; Höltje y Tomasz, 1974; Vollmer y Tomasz, 2001). Esto implica su participación en la distribución y reestructuración del contenido de PCho en la pared celular y la regulación indirecta de la actividad de otras CBPs, así como de la interacción patógeno-hospedador (Hermoso *et al.*, 2005). En este sentido, se ha propuesto que Pce podría disminuir el reconocimiento de la bacteria por la proteína CRP del hospedador tras la eliminación de ciertos residuos de PCho (Hermoso *et al.*, 2005; Kharat y Tomasz, 2006). Se ha demostrado que su actividad *in vivo* está asociada a la colonización de la nasofaringe y adhesión a las células epiteliales pulmonares humanas (Gosink *et al.*, 2000). La inactivación de Pce induce cambios en la morfología de las colonias y, también, supone un incremento de la virulencia en ratones (Vollmer y Tomasz, 2001). El gen *pce* codifica una pre-proteína con un péptido señal de 25 aminoácidos que, tras su escisión, da lugar a la proteína madura (Vollmer y Tomasz, 2001), la cual forma un monómero tanto en su forma libre como unida a la colina (Buey *et al.*, 2007). La interacción entre la enzima y la PCho ocurre entre el grupo fosfato de este aminoalcohol y el centro binuclear del dominio catalítico de la proteína. En este sentido, la configuración del centro activo limita la eliminación a un número reducido de residuos, así como el acceso a la PCho. Pce elimina los residuos situados en el extremo de los WTAs disminuyendo la interacción célula-célula y proporcionando a la bacteria un mecanismo de evasión frente al sistema de defensa del hospedador (Hermoso *et al.*, 2005).

## 2. PATOGÉNESIS DE LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

Para sobrevivir dentro del hospedador, *S. pneumoniae* ha desarrollado la capacidad de colonizar las superficies mucosas del tracto respiratorio superior. A partir de ahí, neumococo es capaz de diseminarse desde la nasofaringe a otros tejidos produciendo enfermedades como otitis media, sinusitis, neumonía, o invadir el torrente sanguíneo y dar lugar a enfermedades invasivas o ENI (neumonía bacteriémica, meningitis o sepsis). Es importante destacar que durante el establecimiento y transición del estado asintomático (portador) al desarrollo de la ENI, ciertos factores de virulencia se expresan de manera diferente y, por ello, contribuyen al éxito de neumococo en distintas localizaciones del hospedador humano (Tabla 1) (Orihuela *et al.*, 2004; Quin *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2011). Uno de los principales factores que determinan el tipo de relación hospedador-patógeno es el serotipo capsular (Weinberger *et al.*, 2010) pero, como ya se ha comentado anteriormente, ciertos serotipos de neumococo son más virulentos en adultos mientras que otros son principalmente causantes de ENI en niños (Henriques *et al.*, 2000). A pesar de que las vacunas conjugadas actuales son eficaces frente a la ENI causada por los serotipos incluidos, su cobertura es limitada y el reemplazo de serotipos por otros no incluidos en las vacunas actuales es un problema muy importante (Bogaert *et al.*, 2004). Se pueden distinguir principalmente tres etapas en el proceso de patogénesis: adhesión/colonización, invasión e inflamación y shock.

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

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

<sup>a</sup> 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.

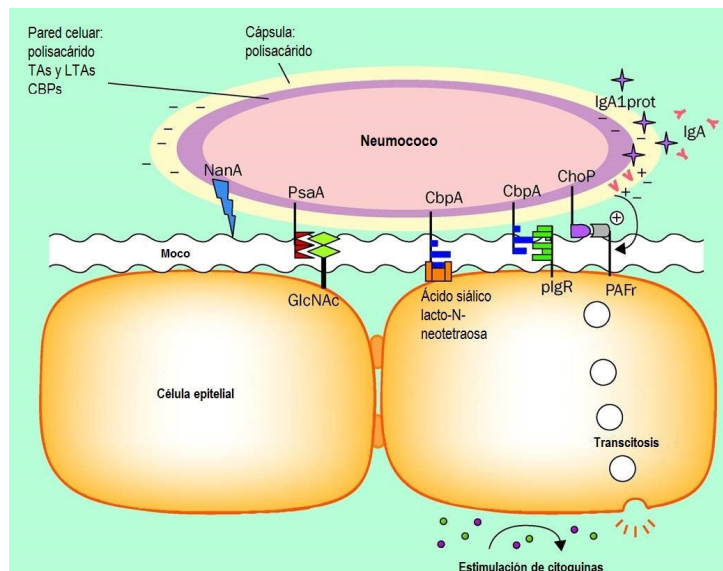
## 2.1. Adhesión/colonización del tracto respiratorio

*S. pneumoniae* se encuentra como un componente habitual asintomático de la microbiota comensal de la nasofaringe y, generalmente, junto a otras bacterias como *H. influenzae* y *Moraxella catarrhalis* (Mackenzie *et al.*, 2010; Sulikowska *et al.*, 2004), particularmente en la población infantil. El estado de portador es un proceso dinámico y el primer paso, casi de forma invariable, para el desarrollo de la enfermedad (Gray *et al.*, 1980). La duración de este estado es variable, desde 1 a 30 semanas, dependiendo del serotipo (Gray *et al.*, 1980; Sleeman *et al.*, 2006). Existen otros factores que influyen en la adquisición y la duración del estado de portador como la época del año, factores inmunológicos, el historial de fumador (activo o pasivo), uso reciente de antimicrobianos, así como las posibles coinfecciones con otros patógenos respiratorios.

El paso de la colonización asintomática al desarrollo de la infección es un proceso complejo, resultado de la interacción entre factores específicos del patógeno y del hospedador. *S. pneumoniae* emplea numerosas estrategias para colonizar los diversos nichos del cuerpo humano entre los cuales tanto las proteínas de superficie celular como las secretadas, desempeñan un papel crucial en la patogénesis (Tabla 1). La primera barrera que neumococo tiene que superar es el moco. Cuando la bacteria entra en la cavidad nasal, las cargas negativas del CPS le protegen de ser atrapado por el moco y permiten a la bacteria alcanzar la superficie del epitelio (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013) (Fig. 3). Cabe destacar, que una vez colonizada la superficie epitelial, la expresión de una cápsula gruesa parece ser una desventaja para la bacteria, ya que ésta posee efecto inhibitorio frente a su adherencia. Por ello, neumococo sufre un cambio de fase entre dos formas capsulares. Durante la etapa de colonización, disminuye la expresión de la cápsula en comparación a cuando se encuentra en el torrente

sanguíneo o en los pulmones (Hergott *et al.*, 2015), dando lugar a la expresión de otros componentes de la pared que promueven la adhesión al epitelio (Weiser *et al.*, 1994). El peptidoglicano y su unión covalente a los WTAs y a la cápsula polisacáridica promueven la supervivencia de la bacteria confiriéndole resistencia frente a muchos componentes presentes en el moco, entre ellos, a la lisozima (Cole *et al.*, 2002).

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). La unión de neumococo a los carbohidratos de la superficie celular es llevada a cabo, entre otras, por la adhesina de superficie A (PsaA) (Fig. 3). Además, neumococo sintetiza otras proteínas de superficie como son las proteasas, que también desempeñan un papel importante en la colonización, como es el caso de la serín-proteasa HtrA (Sebert *et al.*, 2002).



**Fig. 3. Representación de la interacción de *S. pneumoniae* y las células epiteliales.** Adaptación de Bogaert *et al.* (2004), con permiso.

La evolución de estado de portador a ENI requiere la producción de factores inflamatorios locales, como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF), como se observa en otras infecciones. Esta cascada inflamatoria cambia el tipo y número de receptores expresados en las células epiteliales y endoteliales (Song *et al.*, 2013). La PCho es otra molécula de la superficie de neumococo que parece participar en la adhesión de neumococo. Por un lado, sirve de anclaje para las ya nombradas CBPs, las cuales también desempeñan un papel importante en la colonización (Fig. 1 y Tabla 1). Entre éstas caben destacar, la PspC (Fig. 3) —que se une al receptor polimérico de inmunoglobulinas (pIgR), lo que favorece la migración a través del moco (Briles *et al.*, 1997; Hammerschmidt *et al.*, 1997; Rosenow *et al.*, 1997), y posee afinidad por el ácido siálico y por la lacto-*N*-neotetraosa presente en las citoquinas activadas de las células

humanas (Rosenow *et al.*, 1997)— las adhesinas CbpG (Mann *et al.*, 2006) y CbpD (Gosink *et al.*, 2000; Eldholm *et al.*, 2009), así como las hidrolasas LytB, LytC y Pce (Ramos-Sevillano *et al.*, 2011). Por otro lado, la colina muestra una gran afinidad por uno de los receptores que se encuentran incrementados, PAFr. El ligando natural de PAFr también contiene PCho, de modo que neumococo es capaz de unirse por similitud con el ligando natural a dicho receptor, el cual se expresa en diferentes tejidos, como es el epitelio de la nasofaringe (para una descripción más detallada, véase más adelante). La unión a este receptor no sólo promueve la adhesión, sino que también induce la internalización y migración transcelular de neumococo a través de las células epiteliales pulmonares dando lugar a la invasión bacteriana (Cundell *et al.*, 1995; McCullers y Rehg, 2002) (Fig. 3).

Numerosos estudios muestran evidencias de que la formación de biofilmes ocurre de manera natural durante la colonización de la nasofaringe y que los diferentes tipos capsulares influyen de un modo diferente en la capacidad de neumococo para formar estas estructuras (Domenech *et al.*, 2009; Hoa *et al.*, 2009; Moscoso *et al.*, 2006). Además, algunos aislados de neumococo son capaces de expresar una estructura similar a los pili, que se extienden a través del polisacárido capsular y median la adhesión con el epitelio respiratorio (Bagnoli *et al.*, 2008; Hava y Camilli, 2002).

*S. pneumoniae* expresa la toxina intracelular Ply que es una citolisina tiol-activada con afinidad por el colesterol que no sólo produce poros en las membranas celulares, sino también actúa disminuyendo los movimientos ciliares de las células epiteliales, permitiendo que neumococo se adhiera a las mismas con más facilidad sin ser eliminado (Feldman *et al.*, 2002; Feldman *et al.*, 1990). Además, Ply separa las células epiteliales mediante la rotura de las uniones estrechas (Berry *et al.*, 1989; Kadioglu *et al.*, 2002). Se ha descrito que activa la vía clásica del complemento consumiendo componentes esenciales de la misma (Brown *et al.*, 2002) y que puede ser reconocida por el receptor tipo Toll 4 (TLR4), dando lugar a una respuesta inflamatoria (Malley *et al.*, 2003). Se ha visto que Ply provoca la internalización de la bacteria en las células dendríticas, inhibe la activación celular y la secreción de citoquinas (Braun *et al.*, 2002).

## 2.2. Invasión sistémica

Tras la adhesión y la colonización asintomática, *S. pneumoniae* puede diseminarse y dar lugar a ENI. Sin embargo, el mecanismo por el cual neumococo es capaz de invadir el tracto respiratorio inferior no se conoce completamente. Las dificultades observadas en neumococo para adherirse al epitelio ciliado del árbol traqueobronquial, obstaculizando el alcance hacia los alveolos, podrían explicar, siquiera en parte, la baja incidencia de la neumonía en comparación con el estado de portador (McCullers y Tuomanen, 2001). La interacción entre los productos secretados y los componentes de la superficie bacteriana, que se encuentran anclados al epitelio pulmonar, con la respuesta inmune innata del hospedador determinan si se lleva a cabo la invasión. Durante este proceso, neumococo aumenta su adhesión mediante adhesinas que incluyen la familia de triada de histidinas y las proteínas con motivos LPXTG, donde destacan PavB (Jensch *et al.*, 2010), PfbA, PclA y PsrP (Jensch *et al.*, 2010).

Muchos patógenos respiratorios han desarrollado una estrategia común para progresar desde las mucosas y producir bacteriemia conocida como “mimetismo molecular” que es contrarrestada por la respuesta inmune innata inducida posteriormente (Clark y Weiser, 2013; Henriques-

Normark y Tuomanen, 2013; Hergott *et al.*, 2015). Neumococo utiliza un mecanismo mediado por el PAFr para atravesar la barrera epitelial por similitud a su ligando natural, PAF. El PAFr reconoce la PCho presente en los WTAs y LTAs, lo que activa las células epiteliales y endoteliales (Cundell *et al.*, 1995). El PAF es una potente quimioquina con actividad pro-inflamatoria, cuya estructura molecular consiste en un fosfolípido con PCho (Demopoulos *et al.*, 1979) que es producido, principalmente, por plaquetas, células endoteliales, macrófagos y neutrófilos, y que desempeña, por tanto, un papel importante en las reacciones inflamatorias (Ishii y Shimizu, 2000; Prescott *et al.*, 2000). Esta quimioquina lleva a cabo su actividad al unirse al PAFr, provocando un aumento de la permeabilidad endotelial y la extravasación de leucocitos. Debido a la presencia de PCho, también, en el PAF, *S. pneumoniae* puede unirse al PAFr y atravesar las células epiteliales del hospedador produciéndose la invasión y diseminación característica de la ENI (Cundell *et al.*, 1995; Thornton *et al.*, 2010) (Fig. 3). Es interesante señalar que la proteína Pce es capaz no sólo de liberar residuos de PCho de la pared celular bacteriana, sino también de degradar el PAF, por lo que se ha propuesto que esta enzima puede desempeñar un importante papel en la regulación de la virulencia de la bacteria (Hermoso *et al.*, 2005). Estudios adicionales utilizando ratones deficientes en PAFr o tratados con antagonistas del mismo, han demostrado una reducción tanto de la colonización neumocócica como del desarrollo de neumonía y ENI, confirmando la relevancia de este receptor en el proceso invasivo de neumococo (Grigg, 2012; Radin *et al.*, 2005; Rijneveld *et al.*, 2004).

Se ha observado que la ausencia de un PAF funcional no permite la infiltración de neutrófilos, necesarios para la fagocitosis y eliminación eficaz de la bacteria, permitiendo de esta manera a neumococo persistir en las vías respiratorias, diseminarse sistémicamente y transmitirse entre hospedadores (Hergott *et al.*, 2015). Este paso, fundamental en la patogénesis de neumococo, está condicionado por determinadas proteínas de fase aguda —como la CRP del sistema inmune innato— que reconocen y se unen específicamente a la PCho, inhibiendo la unión de ésta al receptor y el proceso concomitante de invasión celular.

Se han descrito otros mecanismos por los cuales *S. pneumoniae* es capaz de atravesar la barrera epitelial. Uno de ellos es mediante PspC (Rosenow *et al.*, 1997), que es la CBP más abundante de neumococo y, entre otras funciones, participa de manera importante en la adhesión a las células del hospedador durante la colonización, así como en la ENI. Como ya se ha comentado, PspC se une al componente secretor del plgR (Elm *et al.*, 2004) (Fig. 3). En condiciones normales el plgR, que se expresa ampliamente en las células epiteliales del tracto respiratorio (Bergmann y Hammerschmidt, 2006), permite el transporte de las inmunoglobulinas IgA o IgM poliméricas a través de las barreras epiteliales desde la zona basolateral hacia el lumen apical (Asano y Komiyama, 2011; Kaetzel, 2005). Adoptando la maquinaria de transcitosis inversa, la unión de neumococo a plgR, a través de PspC, conduce a la internalización y transcitosis de la bacteria a través de las capas epiteliales. El efecto sobre la virulencia de esta CBP puede variar entre cepas debido al elevado polimorfismo de esta proteína (Brooks-Walter *et al.*, 1999; Iannelli *et al.*, 2002). Otro mecanismo descrito consiste en la invasión mediada por la unión de *S. pneumoniae* al plasminógeno y activación de éste. Neumococo contiene varias proteínas que unen plasminógeno (Tabla 1) favoreciendo así la adhesión de la bacteria a la superficie celular.

### 3. MECANISMOS DE DEFENSA DEL HOSPEDADOR

La entrada de patógenos en el hospedador desencadena una serie de respuestas complejas derivadas de la interacción entre éste y el patógeno. El objetivo de estas interacciones es inducir una respuesta inmune apropiada mediante una red de células del sistema inmune innato y sus mediadores moleculares. El sistema inmune innato, que constituye la primera línea de defensa y la más efectiva frente a microorganismos patógenos, está formado por moléculas solubles y células del sistema inmune innato. Entre las moléculas solubles se encuentran el complemento y los péptidos antimicrobianos que se unen al patógeno e inician su eliminación a través de procesos inmunológicos independientes como la fagocitosis. Por otro lado, entre las células que forman la inmunidad innata, caben destacar las células fagocíticas, como son macrófagos y neutrófilos, y las células dendríticas (Kumar *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013). También desempeñan un papel importante las proteínas de fase aguda, como la CRP, así como receptores presentes en las células inmunitarias que constituyen un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa, que es la respuesta específica frente a antígenos que, generalmente, produce memoria inmunológica (Alberts *et al.*, 2002).

#### 3.1. Inmunidad humoral

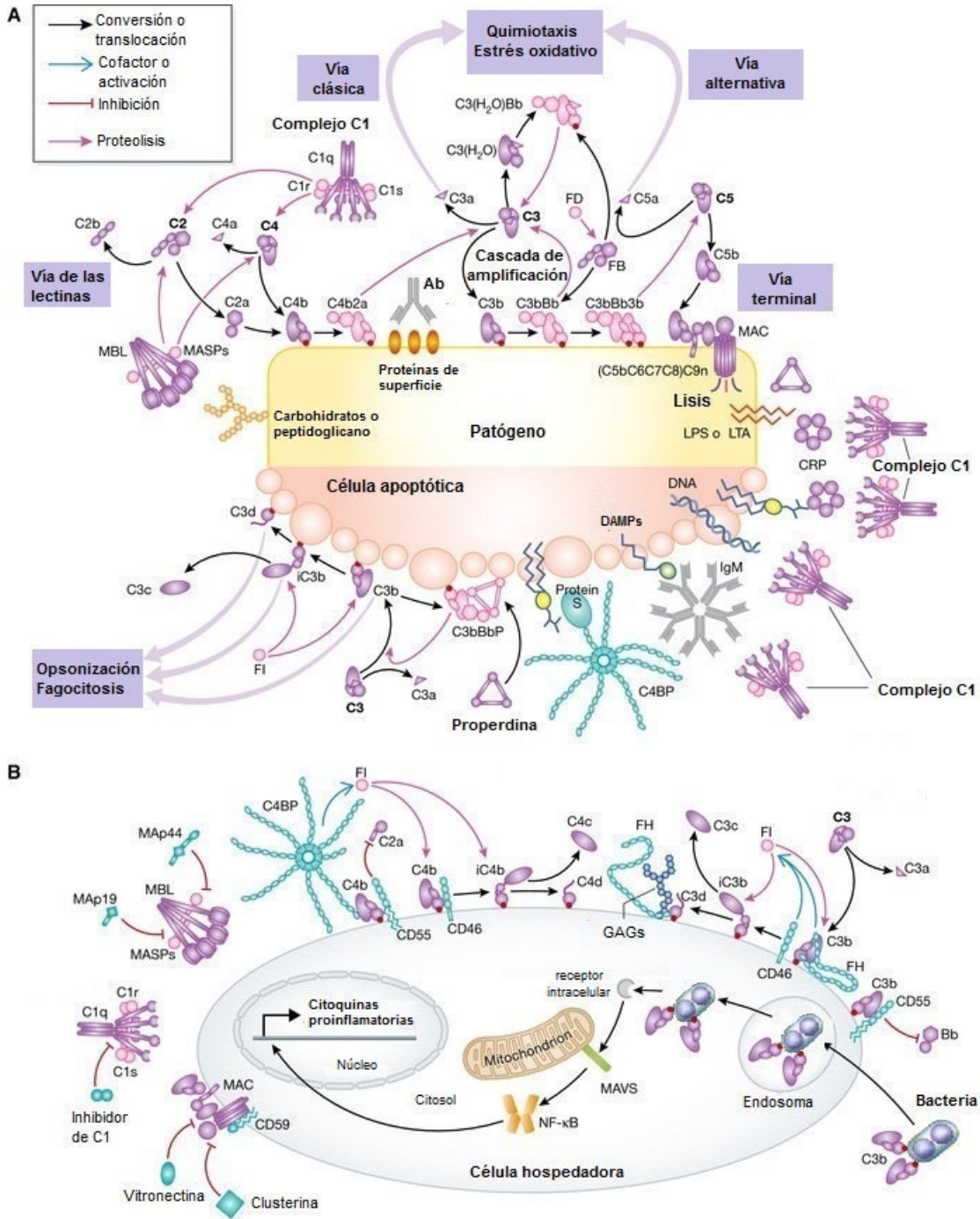
El sistema inmune humano ha desarrollado una elaborada red de cascadas para combatir a los microorganismos patógenos. El sistema del complemento es un componente esencial y eficaz de respuesta inmune, la cual es capaz de reconocer y eliminar rápidamente estos microorganismos. Sin embargo, muchos patógenos han desarrollado distintos mecanismos para escapar del reconocimiento por el complemento para su supervivencia en el hospedador.

##### 3.1.1. El sistema del complemento

El sistema del complemento constituye una de las primeras líneas de defensa frente a patógenos invasores que han superado las barreras mecánicas y químicas del cuerpo humano, y desempeña un papel mediador entre la respuesta inmune innata y la adaptativa. El complemento es un sistema formado por más de 50 proteínas, plasmáticas y de superficie celular, que están organizadas en una jerarquía de cascadas proteolíticas, las cuales interactúan unas con otras para llevar a cabo diversas funciones. La mayoría de las proteínas circulantes están producidas en el hígado, aunque también se produce la síntesis extrahepática en otros tipos celulares como los fibroblastos, células T y B, adipocitos y células endoteliales (Morgan y Gasque, 1997). El complemento se activa con la identificación de la superficie del patógeno y da lugar a la inducción de mediadores pro-inflamatorios (Walport, 2001a), a la opsonización del patógeno mediante diversas opsoninas del complemento como C3b, y a la lisis del patógeno por unión al complejo de ataque a la membrana (MAC), que produce poros en la superficie del microorganismo (Janeway *et al.*, 2001) (Fig. 4). Están establecidos tres sistemas de activación del sistema del complemento: la vía clásica, la alternativa y la de las lectinas, las cuales difieren considerablemente en el primer paso de activación de las mismas (Fig. 4A). Sin embargo, todos los componentes de las tres cascadas convergen, finalmente, en la formación del componente clave C3b.

La vía clásica del complemento (CP) se activa cuando C1q, en un complejo con las serín-proteasas C1r y C1s (complejo C1), se une a la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas, generalmente IgG<sub>1</sub> e IgM, ancladas a la superficie del patógeno. Esta unión desestabiliza a C1q y activa la autocatálisis de C1r que, de manera subsiguiente, escinde C1s, que a su vez hidroliza a C4 y C2 en subunidades grandes (C4b, C2a) y pequeñas (C4a, C2b), donde las dos subunidades grandes se unen para formar un complejo, la convertasa de C3 (C4bC2a) (Muller-Eberhard *et al.*, 1967). Se ha descrito que tanto C1q como las IgM, en ausencia de anticuerpos específicos, pueden reconocer directamente a determinados patógenos como neumococo, aunque también son capaces de unirse a CRP en un complejo con los residuos de PCho de la superficie bacteriana (Szalai *et al.*, 1999; Terrasse *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*, 2014), o bien con otros ligandos como pentraxina-3, SAP y marcadores de daño tisular como el DNA y membranas mitocondriales (Kang *et al.*, 2009; Yuste *et al.*, 2007). La convertasa C3 escinde C3 dando lugar a la anafilotoxina C3a y a la mayor opsonina del sistema del complemento C3b, que, al igual que C4, se une de manera covalente a la superficie del patógeno por un enlace tioéster interno (Law y Dodds, 1997). El componente C3b desempeña un papel clave en la inmunidad mediada por el sistema del complemento, ya que actúa como opsonina reconociendo al microorganismo como un patógeno e induce la fagocitosis a través del receptor del complemento CR1. Por otro lado, la activación de C3b conduce a la producción de anafilotoxinas (C4a, C3a, C5a), que son potentes moléculas pro-inflamatorias, que aumentan el reclutamiento de leucocitos y la permeabilidad vascular, con lo que, además, favorecen la migración de las células fagocitarias al sitio de infección; así como también conduce al ensamblaje del complejo MAC (Walport, 2001a, b). Para la mayoría de los microorganismos, incluido neumococo, la fagocitosis es el principal mecanismo de eliminación del parásito por parte del hospedador. Se ha demostrado que CP es una de las principales vías en la inmunidad innata frente a *S. pneumoniae*, tanto en ratón como en seres humanos, confirmando su importancia en los procesos de reconocimiento y eliminación del microorganismo (Brown *et al.*, 2002; Yuste *et al.*, 2008).

La vía alternativa (AP) se activa cuando el C3b depositado sobre el patógeno se une al factor B (FB) dando lugar a una pro-convertasa C3bB que, de manera subsiguiente, es escindida por el factor D (FD) originando la convertasa de la AP, C3bBb (Fearon *et al.*, 1973), que es funcionalmente homóloga a la convertasa de la vía clásica C3 (C4b2a) permitiendo, de este modo, la amplificación de la activación de la cascada del complemento. Esto ocurre por la generación constitutiva de C3(H<sub>2</sub>O), la forma fluida en el plasma de C3, la cual es muy abundante y se produce tras la reacción de los enlaces tioéster con la molécula de agua (Pangburn *et al.*, 1981). El C3(H<sub>2</sub>O), por unión a FB y FD, da lugar a C3b que, a su vez, forma la convertasa de la vía alternativa C3 (C3bBb) por unión a FB, como se ha explicado anteriormente, estando de esta manera la vía alternativa activada constantemente. La convertasa C3bBb puede ser estabilizada por la properdina (factor P) (Hourcade, 2008), ayudando a amplificar la activación de esta vía. Sin embargo, la activación espontánea de esta vía alternativa podría ser peligrosa y producir fenómenos de autoinmunidad en el hospedador; por ello, se encuentra altamente regulada por proteínas inhibitorias que la mantienen a niveles apropiados en las células hospedadoras. La vida media de C3(H<sub>2</sub>O) es muy corta, ya que es inactivada por la proteasa FI. La importancia de la vía alternativa en la opsonización y eliminación de *S. pneumoniae* se pudo demostrar utilizando ratones con deficiencias en los factores B y D (Brown *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2001).



**Fig. 4. Representación de la activación, amplificación y regulación del sistema del complemento.** Adaptada de Bajic *et al.* (2015), con permiso. (A) Reconocimiento del patógeno y células alteradas. (B) Activación y regulación en la superficie del hospedador. DAMP (DNA, fosfatidilserina, lisofosfatidilserina, lípidos oxidados).

La activación de la vía de las lectinas (LP) funciona de manera análoga, pero independiente de las inmunoglobulinas; se inicia cuando las lectinas de unión a manosa (MBL), colectinas-LK (CL-LK) o alguna de las ficolinas (L, M, H) se unen de manera dependiente de  $Ca^{2+}$ , liberado al plasma como un componente de la respuesta de fase aguda (Bajic *et al.*, 2015; Medzhitov y

Janeway, 2000; Medzhitov y Janeway, 2002), a los carbohidratos y a las regiones similares a colágeno a través de las cuales forman trímeros. Las MBL, también denominadas colectinas, son lectinas de tipo C que forman interacciones múltiples y cuya estabilidad depende de la distribución y geometría de los azúcares. Tanto las MBL como las ficolinas forman complejos con serín-proteasas (MASPs) de 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. En el caso de neumococo, se ha observado que la ficolina L es capaz de unirse a determinados serotipos de neumococo como el 11F, 11A y 11D, reconociendo determinados componentes del CPS del serotipo 11, ya que en ausencia de la cápsula, no se observó ningún tipo de unión (Eisen, 2010; Krarup *et al.*, 2005). Por su parte, la ficolina M se une al CPS de los serotipos 19A y 19F reconociendo, posiblemente, residuos de *N*-acetilmanosamina (Kjaer *et al.*, 2013). Por otra parte, hay que hacer notar que MBL y C1q son moléculas estructuralmente similares, habiéndose sugerido que también pueden unirse a CR1 estimulando directamente la fagocitosis (Wallis *et al.*, 2010). Hasta hace relativamente muy poco tiempo, se aceptaba que la vía de las lectinas desempeñaba un papel poco relevante en el desarrollo de la enfermedad neumocócica ya que, por ejemplo, los polimorfismos en MBL, uno de los activadores principales de esta vía, no parecían estar asociados con un mayor riesgo de ENI (Moens *et al.*, 2006). No obstante, otras investigaciones más recientes sí han encontrado una asociación entre la susceptibilidad a la ENI y la homocigosis para uno de los tres polimorfismos del gen MBL2 (Brouwer *et al.*, 2009; Eisen, 2010). Además, estudios recientes utilizando ratones deficientes en diversas lectinas, han confirmado que estos animales tienen una mayor susceptibilidad a la infección neumocócica (Ali *et al.*, 2012; Endo *et al.*, 2012). Resultados similares han sido observados en humanos (García-Laorden *et al.*, 2013; Garnacho-Montero *et al.*, 2012).

Una vez alcanzado un número límite de moléculas C3b sobre la superficie del patógeno se inicia lo que se ha denominado la vía terminal del complemento (TP) (Bajic *et al.*, 2015) (Fig. 4A). Las convertasas C3 pueden entonces reclutar otra molécula de C3b para formar C3bBb3B (Medicus *et al.*, 1976) y C4b2a3b (Takata *et al.*, 1987), las convertasas C5 de las vías alternativa y clásica, respectivamente. La escisión de C5 puede originar los componentes C5a, que es una potente anafilotoxina, y C5b que es el componente que inicia la formación del MAC. La última forma de esta cascada, el complejo MAC (también llamado C5b-9), junto con la acción de C6, C7, C8 y C9, es capaz de insertarse en la bicapa lipídica que constituye la membrana externa de la bacteria (Kondos *et al.*, 2010). Se cree que son necesarias 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 uno de los miembros de este grupo (Gilbert, 2010). En cualquier caso, hay que hacer notar que, mientras las bacterias Gram-negativas son lisadas por el MAC (Laursen *et al.*, 2012), las Gram-positivas poseen una gruesa pared celular que dificulta notablemente su penetración hasta alcanzar la membrana bacteriana (Joiner *et al.*, 1983; Moffitt y Frank, 1994; Zipfel *et al.*, 2007).

### 3.1.1.1. Regulación del sistema del complemento

Los receptores, efectores y reguladores del complemento interactúan con otras cascadas importantes, como la coagulación y la ruta de señalización de los TLR (Amara *et al.*, 2008; Hawlisch y Kohl, 2006). Esto implica que, tanto la red del complemento como sus interacciones con otros sistemas, están sujetas a un control exhaustivo dado que, si falla, puede dar lugar a daño tisular que derive en enfermedades autoinmunes o inflamatorias crónicas. Existen diferentes reguladores negativos que previenen la activación continua, evitando así el daño tisular (Fig. 4B). La regulación está mediada por componentes solubles localizados en el plasma y por proteínas asociadas a membranas celulares. Los reguladores solubles son C4BP, factor H (fH) y el inhibidor de C1 (C1-INH) que reprimen la activación del complemento al reducir la producción de la convertasa 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 C2a 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). Otro regulador de estas dos vías es el inhibidor de C1 (C1-INH), un miembro de la familia de inhibidores de las serín-proteasas. Éste se une irreversiblemente bloqueando C1r y C1s en el complejo C1, así como a MASP-1 y MASP-2 (Davis, 1988; Degn *et al.*, 2013) (Fig. 4B).

El fH, es uno de los reguladores más potentes y estudiados (Ferreira *et al.*, 2010), y el principal regulador negativo de la vía alternativa controlando la activación del sistema del complemento mediante tres mecanismos. Por un lado, actúa como un cofactor de la serín-proteasa F1 que hidroliza C3b a iC3b, la cual es incapaz de formar la convertasa C3 (Sahu y Lambris, 2001). También, posee un papel importante como acelerador de la desintegración al disociar el factor Bb de la convertasa C3 de la vía alternativa. Además, fH es capaz de competir con el FB por la unión al C3b inactivando, también de esta forma, la activación de la vía alternativa. Por último, fH es un potente regulador negativo del complemento sobre la superficie del hospedador al que se une a través del ácido siálico, heparina y los glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) (Bajic *et al.*, 2015) (Fig. 4). Mediante esta unión fH es capaz de distinguir entre las células propias y no propias, previniendo así la activación del complemento en las células del hospedador (Makou *et al.*, 2013). Otros reguladores solubles del complemento son la proteína S (también denominada vitronectina) y la clusterina (Falgarone y Chiochia, 2009) (Fig. 4A). Ambas inhiben el ensamblaje de MAC o su inserción en la membrana en la vía terminal. Clusterina evita la unión de C9 al complejo C5b-8, mientras que la vitronectina inhibe la asociación del complejo C5b-7 a la superficie celular (Moskovich y Fishelson, 2007; Podack *et al.*, 1978; 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 transmembrana o asociados a membranas de las células del hospedador que les protegen de la activación de complemento, como son CR1, CD46, CD55 y CD59.

### 3.1.1.2. Inactivación directa por *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* ha desarrollado varias estrategias para limitar la opsonofagocitosis (OP) mediada por el complemento. El CPS tiene un papel central, al limitar la cantidad de complemento depositado en la superficie, impedir el acceso a los receptores de éste (Hyams *et al.*, 2010), dificultar la opsonización por C3b/iC3b, tanto por la vía clásica como la alternativa, así como por inhibir la conversión de C3b, unida a la superficie bacteriana, a iC3b. Por otra parte, varias proteínas de superficie (LytC, PspC, PspA, PsaA y PhpA) y Ply contribuyen a la reducción del depósito del complemento (Jarva *et al.*, 2002; Ochs *et al.*, 2008; Quin *et al.*, 2005; Quin *et al.*, 2007; Ramos-Sevillano *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2001). LytA, PspA, junto con Ply, son capaces de inhibir tanto la actividad de la CP como de la AP (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015; Yuste *et al.*, 2005). Existen varias proteínas de neumococo que participan en la evasión de la inmunidad del complemento al reclutar los reguladores negativos fH y C4BP impidiendo que se activen las AP y CP, respectivamente. Este sería el caso de las proteínas LytA, PspC que son capaces de unirse a ambos reguladores de manera simultánea (Dieudonne-Vatran *et al.*, 2009; Ramos-Sevillano *et al.*, 2015).

### 3.1.2. Reconocimiento de *S. pneumoniae* por la proteína de fase aguda CRP

Durante la neumonía neumocócica se produce una potente respuesta inflamatoria local mediada por citoquinas, la cual reduce la carga bacteriana y aumenta la supervivencia del individuo. Esta respuesta mediada por citoquinas se inicia con el reconocimiento por la inmunidad innata de los componentes de la pared celular de la bacteria. Un mecanismo de defensa importante del sistema inmune innato a nivel de las vías respiratorias es el proporcionado por CRP (Gould y Weiser, 2001) que pertenece a la familia de las pentraxinas. Esta proteína es sintetizada rápidamente por el hígado durante la fase aguda de la infección (Macintyre *et al.*, 1982). Como otras moléculas del sistema inmune innato, CRP reconoce ligandos de células apoptóticas y necróticas, así como determinantes de microorganismos (Fig. 4). En el caso de *S. pneumoniae*, CRP comparte con los anticuerpos naturales anti-PCho la capacidad de reconocer residuos de PCho de la pared celular. El papel protector de CRP en las bacteriemias neumocócicas ha sido ampliamente demostrado (Mold *et al.*, 1981; Szalai *et al.*, 1995; Yother *et al.*, 1982b). Mediante su unión a la superficie de la bacteria, CRP lleva a cabo la eliminación de ésta por la activación la CP a través del componente C1q del complemento (Suresh *et al.*, 2006) contribuyendo a que la fagocitosis sea más eficaz. Se ha descrito el efecto protector de CRP en ratones en los que el sistema del complemento estaba inhibido, demostrando que puede mediar la fagocitosis directa por los macrófagos y neutrófilos presentes derivados del sistema circulatorio (Szalai *et al.*, 1996). Además, CRP se une a los receptores Fc $\gamma$  (Fc $\gamma$ R) de los leucocitos, en concreto a Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII (Mold *et al.*, 2002), tanto de los leucocitos humanos como de ratones, los cuales se incrementan en las infecciones neumocócicas, favoreciendo así la fagocitosis (Mortensen y Duszkiwicz, 1977; Thomas-Rudolph *et al.*, 2007) y la producción de citoquinas (Mold y Du Clos, 2006). Sin embargo, aunque los anticuerpos naturales y CRP pueden interactuar con el Fc $\gamma$ R, el mecanismo por el cual se produce la protección frente a *S. pneumoniae* aún no está claro, pero es, probablemente, menor a la demostrada a través del complemento (Mold *et al.*, 2002)

### 3.2. Inmunidad celular

La infección por microorganismos patógenos desencadena una serie de interacciones complejas entre el patógeno y el hospedador, iniciando en éste la activación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa. Las células del sistema inmune innato reconocen un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos denominado patrón molecular asociado a patógenos (PAMP), a través de los receptores conocidos como receptores reconocedores de patógenos (PRR). Los PAMPs son esenciales para la supervivencia y patogenicidad de los microorganismos. El reconocimiento de los PAMPs por los PRRs activa rápidamente diferentes respuestas antimicrobianas a través de la producción de citoquinas inflamatorias, quimioquinas y el interferón de tipo I (IFN-I). Estas respuestas también inician el desarrollo de actuaciones específicas frente al microorganismo patógeno, como es la respuesta inmune adaptativa a través de los linfocitos B y T. Existen numerosas familias celulares y moleculares que expresan PRR, como son las células de la superficie epitelial y las células presentadoras de antígeno, es decir, células dendríticas, monocitos y macrófagos; así como también diversas moléculas presentes en compartimentos intracelulares, torrente sanguíneo y fluidos tisulares. Entre los PRR conocidos caben destacar los receptores TLR, los receptores tipo NOD (NLRs, *NOD-like receptors*) y los sensores citosólicos de DNA, los cuales tienen un papel crucial en la defensa del hospedador. La activación de los PRR conlleva una doble función. Por un lado, se produce la activación de distintos procesos característicos del sistema inmune innato, como son la opsonización, producción de mediadores inflamatorios y fagocitosis, así como, por otro lado, se establece una conexión entre la inmunidad innata y la adquirida (Kumar *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013).

#### 3.2.1. TLRs

Los TLRs son proteínas transmembrana de tipo I que se caracterizan por presentar todos la misma estructura: un dominio extracelular con repeticiones de residuos de leucina (LRR, *leucine-rich repeats*), responsable del reconocimiento de productos microbianos, y un dominio TIR (receptor de Toll/interleuquina-I) de señalización intercelular. Los TLRs en ausencia de ligando tienden a formar dímeros unidos no covalentemente, reclutan diferentes proteínas adaptadoras que inician la cascada de señalización que produce la expresión de citoquinas, quimioquinas e IFNs, así como influyen en la maduración celular y supervivencia. Hasta la fecha se han descrito 10 TLRs en humanos y 13 en ratones, donde los TLR 1 al 9 son comunes en ambos grupos. Los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 están localizados en la membrana plasmática, mientras que los TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR13 se expresan en compartimentos intracelulares, principalmente endosomales y retículo endoplasmático (Fig. 5).

TLR2 reconoce diferentes componentes de la pared celular de neumococo, como son los LTA y lipoproteínas (Schmeck *et al.*, 2006; Schroder *et al.*, 2003; Yoshimura *et al.*, 1999). Además, desempeña un papel indispensable en la respuesta de los macrófagos frente a neumococo (Knapp *et al.*, 2004) y podría ser importante en las fases tempranas de la colonización, disminuyendo la integridad de la barrera epitelial y promoviendo la translocación de neumococo (Clarke *et al.*, 2011). TLR9 es capaz de detectar DNA de neumococo en los endosomas (Albiger *et al.*, 2007), ya que el DNA microbiano, frecuentemente, contiene dinucleótidos CpG no metilados, en comparación con el de mamíferos, que es pobre en estos dinucleótidos y éstos

están metilados en su mayoría. Se ha observado que TLR9 posee una función redundante en el control de la colonización nasofaríngea de neumococo y la meningitis neumocócica (Albiger *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2008). Además, se ha sugerido que tanto los TLR2 como los TLR9, junto con las citoquinas inducidas, son capaces de inducir la fagocitosis de la bacteria y promover la muerte intracelular en los leucocitos (Albiger *et al.*, 2007; Letiembre *et al.*, 2005).

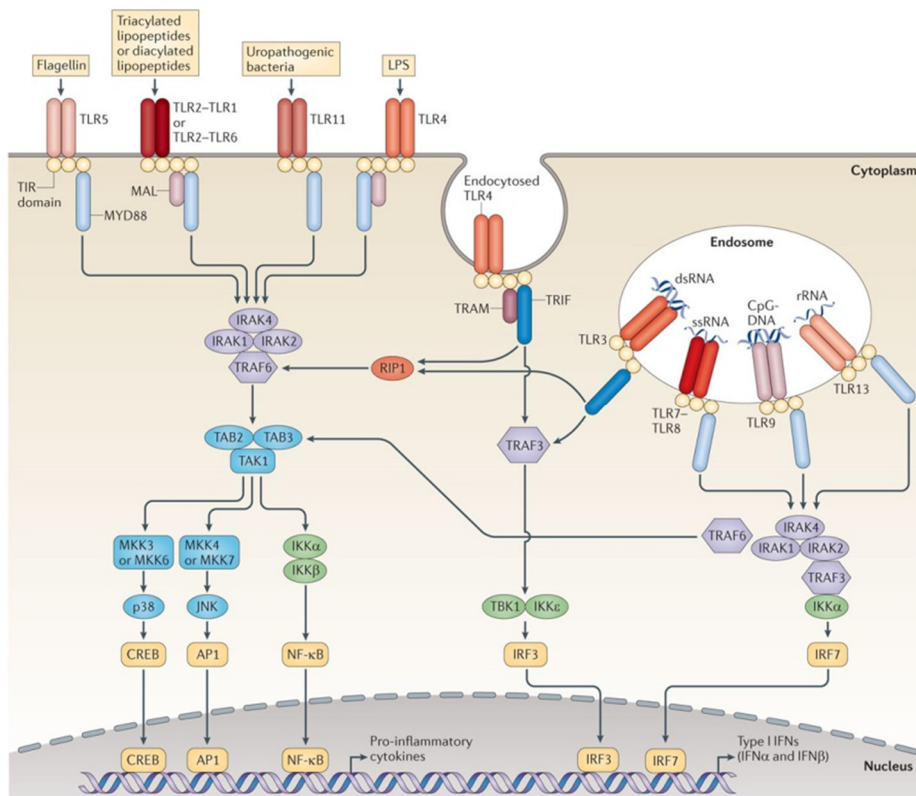


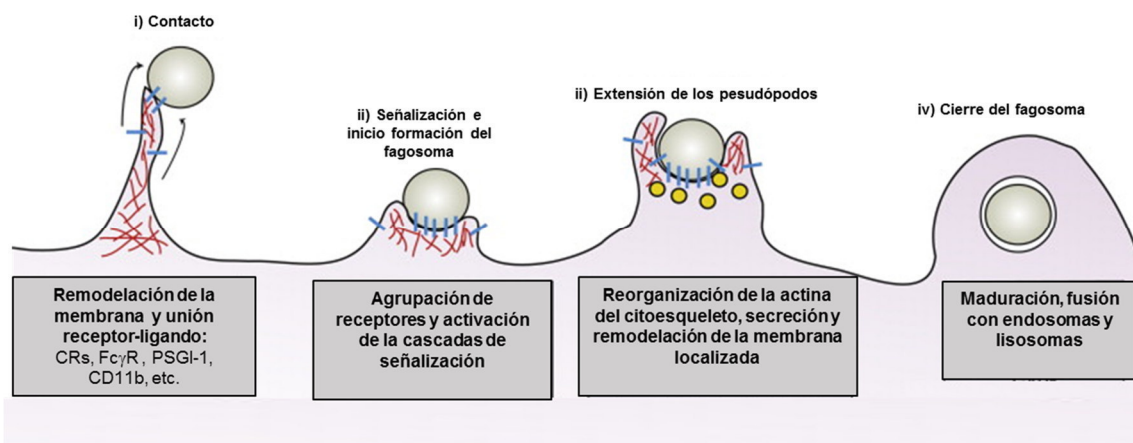
Fig. 5. Representación esquemática de los distintos tipos de TLRs y su localización. O'Neill *et al.* (2013)

A pesar de que TLR4 participa en el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas, existen algunos estudios que sugieren que podría detectar Ply de neumococo promoviendo la liberación de citoquinas, quimioquinas y el reclutamiento de neutrófilos (Dessing *et al.*, 2009). Esto ha sido explicado por la capacidad de TLR4 como mediador de reconocimiento de ligandos endógenos (DAMP). TLR4, junto con la proteína adaptadora MyD88, podrían reconocer IL-6 y TNF- $\alpha$ , liberados por los macrófagos en respuesta al daño celular de Ply (Imai *et al.*, 2008). Hay estudios que muestran que ratones deficientes en TLR4 poseen una elevada susceptibilidad a sufrir una infección fatal tras ser colonizados por neumococo (Koppe *et al.*, 2012; Malley *et al.*, 2003).

### 3.2.2. Fagocitosis

La fagocitosis es el proceso complejo en el que las células “fagocíticas profesionales” del sistema inmune, tales como, neutrófilos, macrófagos o células dendríticas, ingieren partículas sólidas, células muertas y agentes patógenos, y las introducen al interior celular para, posteriormente,

proceder a su eliminación (Fig. 6). Durante este proceso, no sólo se atrapa, englute y mata a los patógenos, sino que las células fagocíticas ayudan a coordinar la respuesta adaptativa presentando antígenos a las células linfoides. En la fagocitosis microbiana, diferentes proteínas séricas (opsoninas) se unen y reconocen a los patógenos para su eliminación (Marriott y Dockrell, 2007). En este proceso, los fagocitos expresan receptores de alta afinidad para ciertas opsoninas, como los receptores  $Fc\gamma$  que se unen a la región constante (Fc) de las moléculas de anticuerpos (IgG, IgM, IgA), así como a los receptores para las proteínas del complemento para el reconocimiento de C3b. El proceso de fagocitosis se puede dividir en varias etapas (Fig. 6). En primer lugar, tras el primer contacto de los fagocitos con el patógeno invasor, se internalizan los microorganismos en vacuolas derivadas de la membrana plasmática denominadas fagosomas. Después de la escisión de la membrana, los fagosomas sufren un proceso complejo de maduración fusionándose secuencialmente con endosomas y lisosomas y, finalmente, se originan los fagolisosomas. Estos últimos, son orgánulos muy ácidos ( $pH \approx 4.5$ ) y ricos en hidrolasas que degradan las bacterias internalizadas (Botelho y Grinstein, 2011; Fairn y Grinstein, 2012). En los fagolisosomas, los patógenos son eliminados por una combinación de mecanismos oxidativos y no oxidativos (Dahlgren y Karlsson, 1999; Nauseef, 2007).



**Fig. 6. Representación de las etapas principales para la formación de los fagosomas en el proceso fagocítico.** Adaptada de Botelho y Grinstein, 2011. Actina-F (rojo), receptores (azul) y vesículas (amarillo).

### 3.2.2.1. Receptores del complemento en las células fagocíticas

Para la mayoría de los microorganismos, incluido neumococo, la fagocitosis es el principal mecanismo de eliminación empleado por parte del hospedador. La acción más importante del complemento es facilitar el reconocimiento y eliminación de los patógenos a través de las células fagocitarias. Esto ocurre por el reconocimiento específico de los componentes del complemento por los receptores del complemento (CRs) en las células fagocíticas. Los CRs se unen a los patógenos opsonizados (principalmente con C3b y en menor medida con C4b). Se han descrito 5 tipos de receptores CR1, CR2, CR3, CR4, CR5a, CR3a, de entre los cuales el mejor caracterizado es el receptor de C3b, CR1 (CD35), el cual se expresa tanto en macrófagos como en leucocitos polimorfonucleares (PMN). Los receptores de este tipo forman un complejo con las proteínas intracelulares de unión a nucleótidos de guanina, también denominados proteínas G.

La forma inactiva de C3b, iC3b, puede actuar como opsonina cuando se une a los receptores CR2 (también denominado CD21) o a CR3 (CD11b:CD18). A diferencia de la unión de iC3b a CR1, la unión a CR3 sí es suficiente para activar la fagocitosis (Janeway *et al.*, 2001).

### 3.2.2.2. Receptores Fc $\gamma$

De entre los receptores que participan en la fagocitosis, los más estudiados han sido los Fc $\gamma$ R (García-García y Rosales, 2002). La unión de éstos a la Fc de las IgG inicia una gran variedad de señales que llevan a la reorganización de la actina del citoesqueleto y la remodelación de la membrana, para la formación de los pseudópodos que darán lugar al fagosoma (Fig. 6). Los Fc $\gamma$ R se clasifican en tres clases: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII y Fc $\gamma$ RIII, donde cada una de estas clases de receptores consisten en diferentes isoformas individuales. Las isoformas Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIA son capaces de mediar la fagocitosis en humanos (García-García y Rosales, 2002; Joshi *et al.*, 2006). Aunque en ratones Fc $\gamma$ RII es un receptor no fagocítico, la actividad de CRP como opsonina requiere de la cadena- $\gamma$  asociada al receptor Fc $\gamma$ RI (Bharadwaj *et al.*, 2001; Mold *et al.*, 2001).

### 3.2.2.3. El ligando de la glicoproteína P-selectina-1 o PSGL-1

El reclutamiento de leucocitos al lugar de la inflamación durante la respuesta inflamatoria es esencial para asegurar la respuesta inmune frente a patógenos, pero este proceso depende en gran medida de la adhesión de los leucocitos circulantes a las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La pérdida de función de las moléculas de adhesión en los leucocitos da lugar a deficiencias en la adhesión, las cuales se asocian con infecciones bacterianas recurrentes debido al reclutamiento fallido de leucocitos hacia el tejido dañado o infectado (Etzioni, 2007). La función de los leucocitos depende de la eficacia de diferentes receptores en las células fagocitarias. La interacción entre las selectinas y los ligandos de las selectinas es esencial para el reconocimiento del patógeno debido al papel crucial que poseen en la extravasación leucocitaria (Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004). Existen tres tipos de selectinas; la L-selectina, que se expresa de modo constitutivo en los leucocitos; y las P-selectina y E-selectina, las cuales son inducidas en respuesta a estímulos inflamatorios como TNF- $\alpha$  e IL-1 en células endoteliales activadas y en plaquetas (Tedder *et al.*, 1995). La activación de estas últimas proporciona protección frente a la invasión de patógenos como *S. pneumoniae* (Bullard *et al.*, 1996; Muñoz *et al.*, 1997). El ligando de la glicoproteína P-selectina-1 (PSGL-1) en los leucocitos media la interacción entre la P-selectina y la E-selectina expresadas en las células endoteliales (McEver y Cummings, 1997). PSGL-1 es una sialomucina homodimérica expresada en la superficie de casi todos los leucocitos y poseen un papel fundamental en la adhesión y trans migración de éstos. El primer contacto de los leucocitos con las células endoteliales esta, principalmente, mediado por las selectinas y su receptor PSGL-1 (Zarbock y Rossaint, 2011). También, es responsable de las primeras etapas de la cascada de extravasación (Sako *et al.*, 1993; Vicente-Manzanares y Sánchez-Madrid, 2004) y, recientemente, se ha demostrado que PSGL-1 está involucrado en la fagocitosis de *S. pneumoniae* a través del reconocimiento del CPS y la proteína de superficie LytA, como PAMPs (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). La expresión de PSGL-1 en la superficie de neutrófilos humanos parece estar regulada por un miembro de la familia de

proteínas denominadas desintegrinas con dominios de tipo metaloproteinasas (ADAM), en concreto por ADAM8, tanto en su forma soluble como unida a la membrana. La proteína ADAM8 se expresa constitutivamente tanto en la superficie celular como a nivel de gránulos intracelulares en los neutrófilos humanos, por lo que se ha sugerido su potencial relevancia en el reclutamiento de neutrófilos a los tejidos dañados durante la respuesta inflamatoria (Domínguez-Luis *et al.*, 2010). La activación de ADAM8 reduce la expresión en la superficie de PSGL-1 pero no afecta a otras moléculas de adhesión. Una vez infiltrados los neutrófilos necesitan disminuir su adhesividad a los vasos sanguíneos y ADAM8 regula este proceso. Se ha demostrado que la eliminación de ADAM8 aumenta los niveles de PSGL-1 y L-selectina, que parece modular la respuesta inflamatoria mediante el desprendimiento de PSGL-1 de la superficie celular (Nishimura *et al.*, 2015; Zarbock y Rossaint, 2011).

#### **4. ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC)**

Las personas inmunocomprometidas, como son aquellas con enfermedades crónicas o diabetes mellitus, constituyen uno de los principales grupos de riesgo para las enfermedades neumocócicas. En adultos, especialmente en aquellos con EPOC, la neumonía adquirida en la comunidad y la ENI constituyen un gran problema global, siendo estos pacientes con EPOC un grupo de riesgo durante todo el año, no sólo en las épocas de invierno (Torres *et al.*, 2015). La EPOC es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias que se manifiesta, generalmente, por la coexistencia de dos enfermedades pulmonares como son la bronquitis crónica y el enfisema (Rom *et al.*, 2013) (Fig. 7). La bronquitis crónica afecta a las vías respiratorias superiores (tráquea y bronquios) produciendo tos, esputo y disnea. Las glándulas mucosas de las vías respiratorias están aumentadas, por lo que se produce una mayor cantidad de moco, mientras que las vías respiratorias se encuentran más estrechadas, siendo la causa de la tos con esputo. Las paredes de las vías respiratorias se encuentran infiltradas con células inflamatorias seguidas, como consecuencia, por procesos de cicatrización, remodelación y engrosamiento de la pared que conllevan a un mayor estrechamiento de las vías. Por otro lado, el enfisema se caracteriza por la obstrucción progresiva e irreversible de los espacios de intercambio gaseoso que lleva asociada la pérdida/destrucción del tejido pulmonar (Rom *et al.*, 2013). El enfisema y la bronquitis crónica contribuyen a la pérdida progresiva de la función pulmonar, a la reducción de la calidad de vida del paciente y al aumento de la mortalidad (MacNee, 2005; Taylor, 2010).

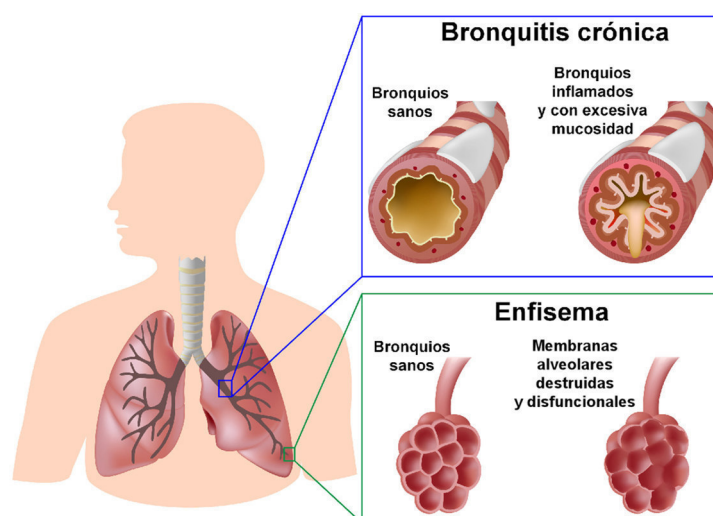
La EPOC se encuentra entre las principales causas de morbilidad y mortalidad entre las enfermedades crónicas en Europa, causando la muerte de entre 200 000 y 300 000 personas al año, y es la causa de más del 90% de las muertes en los países con una renta media o baja. En el año 2015, esta enfermedad causó 3 millones de muertes en todo el mundo (OECD, 2012; WHO, 2016).

El principal factor de riesgo para el desarrollo de la EPOC es el consumo de tabaco, no solo en los fumadores activos, sino también en los pasivos (Nuorti *et al.*, 2000). Existen otros factores de riesgo como son la contaminación del aire interior o exterior, las infecciones virales, la exposición a partículas ocupacionales de polvo inorgánico o agentes químicos nocivos. Sin embargo, las personas que sufren EPOC son generalmente fumadores o ex-fumadores, y los síntomas, raramente, se manifiestan antes de los 40 años. Sin embargo, la exposición pasiva a

humo de tabaco (HT) también favorece la colonización bacteriana y las infecciones en niños (Brook y Gober, 2005a, b; Greenberg *et al.*, 2006). Se ha descrito que los hijos de padres fumadores presentan una mayor tasa de portación de *S. pneumoniae* que los de no fumadores (Greenberg *et al.*, 2006).

#### 4.1. Exacerbaciones agudas en pacientes con EPOC

Las partículas y los gases nocivos presentes en el HT provocan cambios en el sistema inmune del fumador que generan una inflamación pulmonar elevada y crónica. Esta condición inflamatoria persistente provoca cambios patológicos que llevan a la bronquitis obstructiva crónica con fibrosis y a la consiguiente obstrucción de las vías aéreas menores. Asimismo, conduce a la generación de enfisema con destrucción del parénquima pulmonar y a la pérdida de elasticidad pulmonar (Barnes, 2004b; Cosio *et al.*, 2009) (Fig. 7). Una consecuencia adicional del tabaquismo es la infección crónica de las vías respiratorias bajas por patógenos oportunistas. Una gran proporción de los pacientes con EPOC sufren colonizaciones virales o bacterianas del tracto respiratorio inferior, que dan lugar a agudizaciones de la enfermedad, denominadas exacerbaciones agudas asociadas a pacientes con EPOC (EAPEOC). La frecuencia de éstas es de una o dos exacerbaciones al año y el 50% se producen por infecciones bacterianas, las cuales se caracterizan por un mayor incremento de la inflamación sistémica y de las vías respiratorias (Gompertz *et al.*, 2001; Sethi *et al.*, 2008; Wilkinson *et al.*, 2006). La persistencia de las bacterias tras el tratamiento antimicrobiano se debe, posiblemente, a la inflamación crónica observada en estos pacientes, estableciendo así el papel tan importante que tienen en la inflamación durante las exacerbaciones. Las bacterias liberan una gran cantidad de antígenos inflamatorios de pared celular, como son las endotoxinas, fragmentos del peptidoglicano y las proteínas de la membrana externa, que se depositan en las vías respiratorias donde el patrón inflamatorio dependerá del patógeno. Las bacterias más comúnmente asociadas a las EAPEOC son *H. influenzae* (20–30%), *S. pneumoniae* (10–15%) y *M. catarrhalis* (10–15%) (Sethi y Murphy, 2008).



**Fig. 7. Representación gráfica de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).** Afección de las vías respiratorias superiores e inferiores que se manifiesta generalmente por la coexistencia de dos enfermedades pulmonares: la bronquitis crónica y el enfisema. Ayala, (2016)

#### 4.2. Infección bacteriana crónica en pacientes con EPOC y el sistema de defensa innato

A diferencia de lo que, en principio, se observa en los pulmones de pacientes sanos donde las vías respiratorias están estériles, en los enfermos estables de EPOC es común la presencia de algunos patógenos respiratorios, como *S. pneumoniae*. En un 25–50% de los enfermos se detectan patógenos en el esputo, lavado broncoalveolar (BALF) y biopsias bronquiales, y esta tasa aumenta cuanto mayor es la obstrucción de las vías respiratorias (Murphy *et al.*, 2004; Rosell *et al.*, 2005; Sethi *et al.*, 2006). Sin embargo, la colonización se caracteriza por la presencia de patógenos sin daño aparente del hospedador o promoviendo una respuesta protectora por parte de éste. El mantenimiento de los pulmones libres de patógenos depende de la eficiencia de los sistemas de defensa pulmonar, los cuales en los pacientes de EPOC se encuentran dañados. Los adultos afectados poseen una respuesta adaptativa frente a las bacterias, la cual media una protección parcial; por ello, no todas las nuevas colonizaciones por microorganismos patógenos dan lugar a EAEPOC. Se ha observado la presencia de anticuerpos IgG en el suero de pacientes con EPOC en respuesta a infecciones por *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Murphy *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2005; Sethi y Murphy, 2008). En los procesos de exacerbaciones se ha demostrado la presencia de folículos linfoides con altos niveles de linfocitos B en las vías respiratorias inferiores, indicando presencia de respuesta tisular frente a una infección local crónica (Hogg *et al.*, 2004). El desarrollo de una respuesta inmune adaptativa a la bacteria colonizadora apoya el paradigma de que en pacientes EPOC las nuevas colonizaciones son, en realidad, infecciones “latentes” (Sethi y Murphy, 2008).

Como se ha comentado anteriormente, el epitelio mucociliado es la primera línea de defensa frente a patógenos invasores. Sin embargo, el HT daña esta barrera, produce hipersecreción mucosa y reduce la producción de lisozima salivar. Además, daña las propiedades elásticas del epitelio pulmonar y disminuye la capacidad fagocítica profesional de los neutrófilos y macrófagos alveolares, contribuyendo a disminuir la capacidad de eliminar a neumococo del tracto respiratorio inferior (Phipps *et al.*, 2010; Sethi y Murphy, 2008). Asimismo, el HT inhibe la expresión de mediadores inflamatorios, generalmente, producidos tras la colonización por neumococo (Shen *et al.*, 2016). Por lo tanto, el conjunto de las alteraciones producidas por el HT favorece la llegada de microorganismos a las vías respiratorias bajas facilitando la colonización bacteriana de este nicho, la amplificación de la respuesta inflamatoria debido al reconocimiento de los PAMPs y la consiguiente activación y/o reclutamiento de fagocitos profesionales que amplifican el daño epitelial producido por el tabaco.

Los PRRs, que actúan en la primera línea de defensa frente a patógenos, presentan su regulación alterada en fumadores con EPOC en comparación con fumadores asintomáticos y no fumadores. La expresión de TLR2 se encuentra disminuida en los neutrófilos obtenidos del esputo de pacientes EPOC, así como en los macrófagos alveolares de éstos y de pacientes fumadores (Droemann *et al.*, 2005; von Scheele *et al.*, 2011). Sin embargo, la alteración de la expresión de los diferentes receptores de la respuesta inmune innata durante la transición desde la sangre a las vías respiratorias, no sigue el mismo patrón. Se ha descrito que la expresión de TLR4 y TLR9 aumenta en las células T CD8<sup>+</sup> pulmonares en pacientes con EPOC y en células expuestas a HT, lo que contribuye a la mayor producción de citoquinas (Nadigel *et al.*, 2011). Estas células citotóxicas T se consideran marcadores de la EPOC y están incrementadas tanto

en las vías respiratorias centrales como periféricas, contribuyendo a la patogénesis en estos pacientes.

Las células del epitelio respiratorio también desempeñan un papel importante en la respuesta pulmonar innata, no solo como barrera física, sino también dirigiendo la respuesta del hospedador frente al patógeno. En fumadores activos se ha observado una mayor adhesión de bacterias patógenas a las células epiteliales (El Ahmer *et al.*, 1999; Fainstein *et al.*, 1980; Raman *et al.*, 1983). Además, se ha descrito que la exposición *in vitro* a extracto de HT (EHT) estimula la adhesión de *S. pneumoniae* al epitelio respiratorio dependiente de PAFr (Grigg *et al.*, 2012). Grigg y cols. demostraron que los niveles de transcripción de PAFr aumentan en los pulmones de ratones expuestos a EHT y en el epitelio bronquial de fumadores activos, al igual que se ha observado en pacientes fumadores. Además, la activación de las células del hospedador por citoquinas, como TNF- $\alpha$  y la IL- $\alpha$ , también contribuye a la invasión a través de PAFr. La adhesión y entrada de neumococo a las células del hospedador se ha descrito que tiene lugar a través de PAFr de una manera dependiente de IL-1 $\alpha$ . La exposición a HT aumenta la expresión de PAFr e IL-1 $\alpha$  facilitando la invasión de neumococo, mientras que disminuye la expresión nasal de TNF- $\alpha$  y el reclutamiento de neutrófilos (Shen *et al.*, 2016). Sin embargo, no está claro el mecanismo por el cual el EHT aumenta los niveles de PAFr en el epitelio respiratorio pulmonar, ni el efecto sobre la respuesta del hospedador a *S. pneumoniae* en el tracto respiratorio superior. Se ha observado que la deficiencia de PAFr e IL-1 $\alpha$  no impide a los ratones expuestos a HT de sufrir ENI. Esto puede ser debido a la existencia de una diferente regulación de PAFr e IL-1 $\alpha$  en los tractos respiratorios superior e inferior. Mientras que es posible que PAFr contribuya a la infección por neumococo y la diseminación en los pulmones de fumadores, puede que posea poco efecto en el tracto respiratorio superior, dado que su expresión se encuentra disminuida, al igual que IL-1 $\alpha$ , en el epitelio nasal por la exposición al HT (Shen *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha demostrado que la inflamación crónica de los pacientes con EPOC y en los fumadores asintomáticos se caracteriza por una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias, como son IL-6 e IL-8 (Bhowmik *et al.*, 2000; Sethi y Murphy, 2008), por el reclutamiento de diferentes tipos celulares a los pulmones, incluyendo las células encargadas de la respuesta inmune innata, neutrófilos y macrófagos (Kumar *et al.*, 2007), así como de las células encargadas de la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T y B (Finkelstein *et al.*, 1995; Hogg *et al.*, 2004). Se han observado mayores niveles de neutrófilos en el esputo y BALF de pacientes con EPOC y fumadores activos. Sin embargo, en ratones expuestos a HT se ha demostrado que la actividad fagocítica de todos los granulocitos y monocitos circulatorios se encuentra inhibida (Voss *et al.*, 2015). El número de macrófagos alveolares también se ve aumentado en el BALF de los fumadores (Barnes, 2004a) y, de la misma manera, la exposición a HT altera el fenotipo de éstos (Skold *et al.*, 1996). Sin embargo, la función de los macrófagos, al igual que se observa en los neutrófilos, está significativamente disminuida por el HT (Hodge *et al.*, 2003; Kirkham *et al.*, 2004; Ortega *et al.*, 1994; Ortega *et al.*, 1992). El HT también altera proteínas de la matriz extracelular de los macrófagos disminuyendo, drásticamente, la habilidad para fagocitar neutrófilos apoptóticos (Kirkham *et al.*, 2004). En ratones expuestos crónicamente a HT se han observado altos nivel de colonización debido a la inhibición de la función inmune innata de las células epiteliales respiratorias, incluyendo la expresión de péptidos antimicrobianos, un aumento de la adherencia bacteriana a las células epiteliales y la inhibición de la capacidad fagocítica de los macrófagos y neutrófilos (Voss *et al.*, 2015).

La exposición de neumococo a HT también afecta directamente a la capacidad de la bacteria de producir biofilmes. Se ha demostrado con aislados expuestos durante 16 h a condensado de HT, la fracción particulada del HT, que éste no sólo aumenta la formación de biofilmes (en ausencia de niveles detectables de crecimiento), sino que también se inhibe la capacidad de formar poros por la principal toxina, Ply. Estas dos acciones, en conjunto, contribuyen a la colonización y persistencia de *S. pneumoniae* (Hutcherson *et al.*, 2015; Mutepe *et al.*, 2013).

### 4.3. Tratamiento antibiótico en EPOC

El estudio GOLD (*Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) es el principal método empleado por los sistemas de salud para describir el grado de severidad de los pacientes con EPOC y es el documento que define las terapias recomendadas para cada grado de la enfermedad en función de las evidencias observadas en años anteriores. La clasificación actual se divide en cuatro estadios, basados en las dificultades observadas para respirar teniendo en cuenta principalmente la espirometría (Tabla 2). Para ello, es importante evaluar el estado de salud del paciente, el riesgo de futuros eventos de exacerbación y la presencia de comorbilidades (GOLD, 2016).

**Tabla 2.** Clasificación de la severidad de limitación de aire en EPOC. Sobre la base de FEV<sub>1</sub> tras el uso de broncodilatadores.

Estadio GOLD		Descripción	Síntomas
<b>Pacientes con FEV<sub>1</sub>/FVC &lt; 0.70:</b>			
I	Leve	FEV <sub>1</sub> ≥ 80% del valor predicho	Probables
II	Moderado	50% ≤ FEV <sub>1</sub> < 80% del valor predicho	Pueden ser crónicos
III	Severo	30% ≤ FEV <sub>1</sub> < 50% del valor predicho	Pueden ser crónicos
IV	Muy severo	FEV <sub>1</sub> < 30% del valor predicho	Crónicos y severos

<sup>a</sup> FEV<sub>1</sub>, volumen espiratorio forzado en un segundo; FVC, capacidad vital forzada; FEV<sub>1</sub>/FVC, es la relación, en porcentaje, de la capacidad forzada que se espira en el primer segundo, del total exhalado para la capacidad vital forzada. Su valor normal es superior al 80%, por lo que se ha establecido que valores inferiores a 0.70 se consideren limitación de aire.

El tratamiento farmacológico apropiado puede reducir los síntomas, la frecuencia y severidad de las EAEPOC, mejorando así la calidad de vida del paciente. Sin embargo, hasta la fecha, ningún medicamento parece ser concluyente para reducir/evitar el deterioro de la función pulmonar. Durante las exacerbaciones, el primer tratamiento empleado para aliviar los síntomas son los broncodilatadores de larga o corta acción. Otro tratamiento muy empleado son los corticoesteroides inhalados (ICS), en ocasiones en combinación con los anteriores. Sin embargo, los efectos de los ICS como tratamiento para EPOC debido a sus efectos sobre la inflamación pulmonar y sistémica son muy controvertidos. Existen estudios que demuestran el efecto beneficioso de los ICS disminuyendo las exacerbaciones, mejorando la función pulmonar y los síntomas de los pacientes con EPOC (Barbier *et al.*, 2008; Burge *et al.*, 2000; Calverley *et al.*, 2003; Mahler *et al.*, 2002). Sin embargo, otros estudios muestran el aumento de la incidencia y riesgo de muerte por neumonía adquirida en la comunidad en pacientes con EPOC tratados con ICS, en concreto, con la fluticasona (Calverley *et al.*, 2007; Ernst *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*,

2008; Patterson *et al.*, 2012; Wedzicha *et al.*, 2008). Se ha propuesto que las diferencias en las características del patógeno causante de la EAEPOC pueden ser críticas para determinar el efecto de los ICS en la susceptibilidad del hospedador a sufrir neumonías (Patterson *et al.*, 2012).

## 5. MODELOS ANIMALES DE ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

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

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

Al igual que ocurre con el hospedador y dependiendo de la cepa de neumococo utilizada, existe una gran variabilidad en la infección causada por *S. pneumoniae* en los modelos experimentales. La virulencia de neumococo, tanto en seres humanos como en ratones, se ve afectada por el serotipo capsular. En general, los serotipos de neumococo asociados a resistencia antibiótica suelen ser mucho menos virulentos, en modelos animales, que los serotipos sensibles (Briles *et al.*, 1992). Así, los neumococos de los serotipos 2, 3, 4, 5 y 6 suelen ser virulentos en ratones, mientras que los de serotipos 9V, 14, 19 y 23 son relativamente avirulentos (Benton *et al.*, 1997; Briles *et al.*, 1992).



## **II. OBJETIVOS**



*S. pneumoniae* es uno de los principales patógenos causantes de enfermedad invasiva en todo el mundo, pudiendo, también, producir infecciones recurrentes del tracto respiratorio inferior, como ocurre en los pacientes que sufren EPOC. Las vacunas conjugadas existentes confieren protección frente a la ENI. Sin embargo, el reemplazo capsular permite a los clones preexistentes de neumococo que expresan serotipos vacunales escapar de la inmunidad inducida por la vacunación mediante la adquisición de genes capsulares de neumococo no incluidos en las vacunas actuales. Por ello, resulta esencial la vigilancia epidemiológica y la caracterización de los aislados no vacunales emergentes causantes de ENI, así como comprender mejor los mecanismos de patogenicidad que puedan conducir al éxito de ciertos secuencitipos, con especial importancia aquellos asociados a infecciones recurrentes en pacientes con EPOC.

Entre los principales factores de riesgo que aumentan la susceptibilidad de padecer neumonías neumocócicas, destaca el hábito de fumar y, por lo tanto, la exposición al humo de tabaco. Los serotipos 11A y 16F de *S. pneumoniae* están más frecuentemente asociados a producir episodios de exacerbaciones en pacientes con EPOC, enfermedad altamente relacionada con el tabaquismo. En el desencadenamiento de estos procesos están involucrados tanto los diferentes factores de virulencia del patógeno, como los diversos mecanismos celulares y sistemas de defensa del propio hospedador, responsables del reconocimiento y eliminación del microorganismo. Por ello, el conocimiento detallado de los cambios genéticos y biológicos en la bacteria y el hospedador modulados por la exposición al tabaco es esencial para combatir la persistencia pulmonar que es frecuente en estos pacientes con EPOC.

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

- 1. Caracterización epidemiológica y molecular de la emergencia de variantes de neumococo resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos que expresan el serotipo 11A.**
- 2. Identificar los mecanismos bacterianos implicados en la persistencia pulmonar inducidos por la exposición al humo de tabaco.**
- 3. Investigar los cambios en el hospedador derivados de la exposición al humo de tabaco que puedan afectar al desarrollo de infección persistente en pacientes con EPOC, así como evaluar el uso de corticoides como tratamiento.**
- 4. Valorar el impacto de la exposición al humo de tabaco en el establecimiento de la neumonía neumocócica utilizando modelos murinos de infección.**
- 5. Analizar el impacto del humo del tabaco a nivel genómico en aislados clínicos de *S. pneumoniae*.**



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. CEPAS BACTERIANAS Y CRECIMIENTO

### 1.1. Estirpes bacterianas y oligonucleótidos

Las estirpes bacterianas 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* empleadas en los estudios relacionados con la emergencia de aislados resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos que expresan el serotipo 11A.

Estirpe (nº acceso)	Año <sup>a</sup>	Descripción <sup>b</sup> (origen; serotipo/secuencitipo)	Referencia/Procedencia <sup>c</sup>
ATCC 700671	–	–; Spain <sup>9V</sup> -ST156	Sadowy <i>et al.</i> , 2010
R6 (AE008540)	–	–; NC/ST595(7,5,1,1,10,7,15)	Hoskins <i>et al.</i> , 2001
AP200 (CP002121)	–	–; 11A/ST62	Camilli <i>et al.</i> , 2008
HUB10926	–	–; 11A/ST62	–
ATCC 49619	–	–; 19F/–	–
CGSP14 (CP001033)	–	–; 14/–	–
333	2012	Sangre; 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	LRN
503	2012	Sangre; 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	LRN
1181	2012	Sangre; 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	LRN
815	2012	Sangre; 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	LRN
881	2012	LCR; 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	LRN
450	2012	Sangre; 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN
3290	2010	Sangre; 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN
421	2010	Sangre; 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN
2442	2010	LCR; 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN
3287	2010	Sangre; 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN
822	2010	Sangre; 11A/ST838 (7,11,10,1,6,8,90)	LRN
2289	2010	Sangre; 11A/ST838 (7,11,10,1,6,8,90)	LRN
2644	2012	Sangre; 11A/ST838 (7,11,10,1,6,8,90)	LRN
3867	2010	Sangre; 11A/ST838 (7,11,10,1,6,8,90)	LRN
324	2012	Sangre; 11A/ST838 (7,11,10,1,6,8,90)	LRN

<sup>a</sup> Año del aislamiento de la estirpe bacteriana.

<sup>b</sup> LCR, líquido cefalorraquídeo; ST, secuencitipo.

<sup>c</sup> LRN, Laboratorio de Referencia de Neumococo del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Madrid).

**Tabla 4.** Estirpes bacterianas de *S. pneumoniae* empleadas en los estudios del impacto del HT en las enfermedades neumocócicas.

Estirpe (nº acceso)	Año <sup>a</sup>	Descripción <sup>b</sup> (origen o tipo de aislado; serotipo/secuencitipo)	Procedencia <sup>c</sup>
3499	1995	EAEOC; 11A/ST62	IDIBELL
8504	2007	EAEOC; 11A/ST62	IDIBELL
9027	2008	EAEOC; 11A/ST62	IDIBELL
9755	2009	EAEOC; 11A/ST6521	IDIBELL
9904	2009	EAEOC; 11A/ST6521	IDIBELL
6804	2003	EAEOC; 16F/ST30	IDIBELL
7210	2004	EAEOC; 16F/ST30	IDIBELL

MATERIALES Y MÉTODOS

8227	2006	EAEPOC; 16F/ST30	IDIBELL
8282	2006	EAEPOC; 16F/ST30	IDIBELL
9596	2009	EAEPOC; 16F/ST30	IDIBELL
234	2011	ENI; 16F/ST30	LRN
1571	2011	ENI; 16F/ST30	LRN
1722	2012	ENI; 16F/ST30	LRN
414	2012	ENI; 16F/ST30	LRN
1089	2011	ENI; 16F/ST30	LRN
3290	2010	ENI; 11A/ST6521	LRN
1181	2012	ENI; 11A/ST62	LRN
815	2012	ENI; 11A/ST62	LRN
450	2010	ENI; 11A/ST6521	LRN
2442	2010	ENI; 11A/ST6521	LRN
3499HT	–	súper EPOC; 11A/–	Esta Tesis
8504HT	–	súper EPOC; 11A/–	Esta Tesis
9027HT	–	súper EPOC; 11A/–	Esta Tesis
9755HT	–	súper EPOC; 11A/–	Esta Tesis
9904HT	–	súper EPOC; 11A/–	Esta Tesis
6804HT	–	súper EPOC; 16F/–	Esta Tesis
7210HT	–	súper EPOC; 16F/–	Esta Tesis
8227HT	–	súper EPOC; 16F/–	Esta Tesis
8282HT	–	súper EPOC; 16F/–	Esta Tesis
9596HT	–	súper EPOC; 16F/–	Esta Tesis
234HT	–	tipo EPOC; 16F/–	Esta Tesis
1571HT	–	tipo EPOC; 16F/–	Esta Tesis
1722HT	–	tipo EPOC; 16F/–	Esta Tesis
414HT	–	tipo EPOC; 16F/–	Esta Tesis
1089HT	–	tipo EPOC; 16F/–	Esta Tesis
3290HT	–	tipo EPOC; 11A/–	Esta Tesis
1181HT	–	tipo EPOC; 11A/–	Esta Tesis
815HT	–	tipo EPOC; 11A/–	Esta Tesis
450HT	–	tipo EPOC; 11A/–	Esta Tesis
2442HT	–	tipo EPOC; 11A/–	Esta Tesis
D39 (CP000410)	–	2/ST595	Lanie <i>et al.</i> , 2007
O92	–	D39 <i>lytA::cat</i> ; CHL <sup>R</sup>	Ramos-Sevillano <i>et al.</i> , 2015
P128	–	R6 <i>pce::Ery</i> <sup>R</sup>	CIB-CSIC
LM1	–	Cepa 6804/03 <i>pce</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM2	–	Cepa 8282/06 <i>pce</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM3	–	Cepa 8227/06 <i>pce</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM4	–	Cepa 9027/08 <i>pce</i> ; 11A/ST62	Esta Tesis
LM5	–	Cepa 9755/09 <i>pce</i> ; 11A/ST6521	Esta Tesis
LM6	–	Cepa 414/12 <i>pce</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM7	–	Cepa 1722/12 <i>pce</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM8	–	Cepa 1087/11 <i>pce</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM9	–	Cepa 234/11 <i>pce</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis

LM10	-	Cepa 1571/11 <i>pce</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM11	-	Cepa 503/12 <i>pce</i> ; 11A/ST62	Esta Tesis
LM12	-	Cepa 1181/12 <i>pce</i> ; 11A/ST62	Esta Tesis
LM13	-	Cepa 3290/10 <i>pce</i> ; 11A/ST6521	Esta Tesis
LM14	-	Cepa 6804/03 <i>lytA</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM15	-	Cepa 8282/06 <i>lytA</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM16	-	Cepa 8227/06 <i>lytA</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM17	-	Cepa 7210/04 <i>lytA</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM18	-	Cepa 9027/08 <i>lytA</i> ; 11A/ST62	Esta Tesis
LM19	-	Cepa 9755/09 <i>lytA</i> ; 11A/ST6521	Esta Tesis
LM20	-	Cepa 9904/09 <i>lytA</i> ; 11A/ST6521	Esta Tesis
LM21	-	Cepa 3499/95 <i>lytA</i> ; 11A/ST62	Esta Tesis
LM22	-	Cepa 8504/07 <i>lytA</i> ; 11A/ST6521	Esta Tesis
LM23	-	Cepa 414/12 <i>lytA</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM24	-	Cepa 1722/12 <i>lytA</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM25	-	Cepa 1087/11 <i>lytA</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM26	-	Cepa 234/11 <i>lytA</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM27	-	Cepa 1571/11 <i>lytA</i> ; 16F/ST30	Esta Tesis
LM28	-	Cepa 503/12 <i>lytA</i> ; 11A/ST62	Esta Tesis
LM29	-	Cepa 1181/12 <i>lytA</i> ; 11A/ST62	Esta Tesis
LM30	-	Cepa 3290/10 <i>lytA</i> ; 11A/ST6521	Esta Tesis
LM31	-	Cepa 421/10 <i>lytA</i> ; 11A/ST6521	Esta Tesis
1722R1	-	Cepa 1722; 16F <sup>*</sup> /-	Esta Tesis
1722R2	-	Cepa 1722R1; 16F <sup>*</sup> /-	Esta Tesis
1722R3	-	Cepa 1722 R2; 16F <sup>*</sup> /-	Esta Tesis
1722R4	-	Cepa 1722 R3; 16F <sup>*</sup> /-	Esta Tesis
1722R4HT	-	Cepa 1722 R4; 16F <sup>*</sup> /-	Esta Tesis

<sup>a</sup> Año del aislamiento de la estirpe bacteriana. -; desconocido o no procede.

<sup>b</sup> EAEPOC, exacerbación aguda en un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ENI, enfermedad neumocócica invasiva; ST, secuencitipo; CHL, cloranfenicol; ERY, eritromicina; NC, no capsulada; <sup>\*</sup>, modificada tras el pase por sangre de ratón.

<sup>c</sup> IDIBEL, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona). Estas cepas fueron cedidas por las Dras. J. Liñares y C. Ardanuy; LRN, Laboratorio de Referencia de Neumococo del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Madrid); CIB-CSIC, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid. Cedido por el Prof. Ernesto García.

**Tabla 5.** Estirpes bacterianas de *S. pneumoniae* empleadas en los estudios de secuenciación del genoma completo.

Código Sanger	Estirpe	Año <sup>a</sup>	Descripción <sup>b</sup> (origen del aislamiento; serotipo/secuencitipo)	Procedencia <sup>c</sup>	Nº acceso
–	ATCC 700669	–	23F/ST81	Croucher <i>et al.</i> , 2009	FM211187
19536_2#1	6448	2002	EAEPOC 19F/ST2313 (2,5,36,12,8,21,7)	IDIBELL	ERR1516089
19536_2#10	9604	2009	EAEPOC 23A/ST42 (1,8,9,9,6,4,6)	IDIBELL	ERR1516098
19536_2#11	9707	2009	EAEPOC 31/ST1111* (1,5,4,1,46,14,18)	IDIBELL	ERR1516099
19536_2#12	9725	2009	EAEPOC 3/ST260 (26,9,15,14,9,16,19)	IDIBELL	ERR1516100
19536_2#13	9762	2009	EAEPOC 31/ST1684 (1,2,29,1,15,155,18)	IDIBELL	ERR1516101
19536_2#14	9832	2009	EAEPOC 23B/ST2372 (18,13,8,6,3,6,46)	IDIBELL	ERR1516102
19536_2#15	9833	2009	EAEPOC 31/ST1766 (1,5,29,1,46,14,18)	IDIBELL	ERR1516103
19536_2#16	9846	2009	EAEPOC 3/ST180 (7,15,2,10,6,1,22)	IDIBELL	ERR1516104
19536_2#17	9847	2009	EAEPOC 22F/ST433 (1,1,4,1,18,58,17)	IDIBELL	ERR1516105
19536_2#18	9873	2009	EAEPOC 22F/ST433 (1,1,4,1,18,58,17)	IDIBELL	ERR1516106
19536_2#19	9891	2009	EAEPOC 23A/ST42 (1,8,9,9,6,4,6)	IDIBELL	ERR1516107
19536_2#2	6838	2003	EAEPOC 19F/ST88 (5,5,7,7,8,5,7)	IDIBELL	ERR1516090
19536_2#20	9896	2009	EAEPOC 19F/ST51 (7,14,4,12,1,1,6)	IDIBELL	ERR1516108
19536_2#21	9920	2009	EAEPOC 19A/ST81 (4,4,2,4,4,1,1)	IDIBELL	ERR1516109
19536_2#22	10003	2009	EAEPOC 33F/ST1012 (2,5,29,18,42,3,18)	IDIBELL	ERR1516110
19536_2#23	10054	2009	EAEPOC 10A/ST97 (5,7,4,2,10,1,27)	IDIBELL	ERR1516111
19536_2#24	10087	2010	EAEPOC 19A/ST4831 (1,98,1,12,17,3,8)	IDIBELL	ERR1516112
19536_2#25	10160	2010	EAEPOC 22F/ST433 (1,1,4,1,18,58,17)	IDIBELL	ERR1516113
19536_2#26	10201	2010	EAEPOC 23B/ST439 (1,8,9,2,6,4,6)	IDIBELL	ERR1516114
19536_2#27	10210	2010	EAEPOC 10A/ST97 (5,7,4,2,10,1,27)	IDIBELL	ERR1516115
19536_2#28	10369	2010	EAEPOC 6C/ST4310 (32,28,1,1,15,1,14)	IDIBELL	ERR1516116
19536_2#29	10408	2010	EAEPOC 10A/ST97 (5,7,4,2,10,1,27)	IDIBELL	ERR1516117
19536_2#3	8237	2006	EAEPOC 3/ST180 (7,15,2,10,6,1,22)	IDIBELL	ERR1516091
19536_2#30	10425	2010	EAEPOC 3/ST180 (7,15,2,10,6,1,22)	IDIBELL	ERR1516118
19536_2#31	10458	2010	EAEPOC 22F/ST433 (1,1,4,1,18,58,17)	IDIBELL	ERR1516119
19536_2#32	10475	2010	EAEPOC 3/ST1220 (26,1,15,14,9,16,19)	IDIBELL	ERR1516120
19536_2#33	10499	2011	EAEPOC 22F/ST433 (1,1,4,1,18,58,17)	IDIBELL	ERR1516121
19536_2#34	10541	2011	EAEPOC 23B/ST2372 (18,13,8,6,3,6,46)	IDIBELL	ERR1516122
19536_2#35	10544	2011	EAEPOC 19F/ST87 (5,5,7,7,8,5,4)	IDIBELL	ERR1516123
19536_2#36	10596	2011	EAEPOC 19A/ST4310 (32,28,1,1,15,1,14)	IDIBELL	ERR1516124
19536_2#37	10611	2011	EAEPOC 23A/ST2670 (7,43,53,6,25,6,8)	IDIBELL	ERR1516125
19536_2#38	10762	2011	EAEPOC 6C/ST386 (32,28,1,1,15,52,14)	IDIBELL	ERR1516126
19536_2#39	10779	2011	EAEPOC 19F/ST177 (7,14,4,12,1,1,14)	IDIBELL	ERR1516127
19536_2#4	8485	2007	EAEPOC 6C/ST1692 (1,5,7,12,17,158,14)	IDIBELL	ERR1516092
19536_2#40	10867	2012	EAEPOC 31/ST1684 (1,2,29,1,15,155,18)	IDIBELL	ERR1516128
19536_2#41	10888	2012	EAEPOC 23B/ST2372 (18,13,8,6,3,6,46)	IDIBELL	ERR1516129
19536_2#42	10993	2012	EAEPOC 6C/ST4310 (32,28,1,1,15,1,14)	IDIBELL	ERR1516130
19536_2#43	11073	2012	EAEPOC 3/ST180 (7,15,2,10,6,1,22)	IDIBELL	ERR1516131
19536_2#44	11107	2012	EAEPOC 22F/ST433 (1,1,4,1,18,58,17)	IDIBELL	ERR1516132
19536_2#45	11113	2012	EAEPOC 23B/ST387 (7,13,8,6,3,6,8)	IDIBELL	ERR1516133

19536_2#46	11121	2012	EAEPOC 23B/ST2372 (18,13,8,6,3,6,46)	IDIBELL	ERR1516134
19536_2#47	11153	2012	EAEPOC 3/ST260 (26,9,15,14,9,16,19)	IDIBELL	ERR1516135
19536_2#48	11181	2012	EAEPOC 33F/ST1012 (2,5,29,18,42,3,18)	IDIBELL	ERR1516136
19536_2#49	11360	2013	EAEPOC 19A/ST320 (4,16,19,15,6,20,1)	IDIBELL	ERR1516137
19536_2#5	8949	2008	EAEPOC 10A/ST97 (5,7,4,2,10,1,27)	IDIBELL	ERR1516093
19536_2#50	11539	2013	EAEPOC 6C/ST386* (32,28,1,1,15,52,1)	IDIBELL	ERR1516138
19536_2#51	3499	1995	EAEPOC 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	IDIBELL	ERR1516139
19536_2#52	8504	2007	EAEPOC 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	IDIBELL	ERR1516140
19536_2#53	9027	2008	EAEPOC 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	IDIBELL	ERR1516141
19536_2#54	9755	2009	EAEPOC 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	IDIBELL	ERR1516142
19536_2#55	9904	2009	EAEPOC 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	IDIBELL	ERR1516143
19536_2#56	6804	2003	EAEPOC 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	IDIBELL	ERR1516144
19536_2#57	7210	2004	EAEPOC 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	IDIBELL	ERR1516145
19536_2#58	8227	2006	EAEPOC 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	IDIBELL	ERR1516146
19536_2#59	8282	2006	EAEPOC 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	IDIBELL	ERR1516147
19536_2#6	9332	2008	EAEPOC 19A/ST2110 (8,10,2,16,17,26,1)	IDIBELL	ERR1516094
19536_2#60	9596	2009	EAEPOC 16F/ST7006 (1,5,27,20,1,1,476)	IDIBELL	ERR1516148
19536_2#61	234	2011	ENI 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	LRN	ERR1516149
19536_2#62	1571	2011	ENI 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	LRN	ERR1516150
19536_2#63	1722	2012	ENI 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	LRN	ERR1516151
19536_2#64	414	2012	ENI 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	LRN	ERR1516152
19536_2#65	1089	2011	ENI 16F/ST30* (1,5,27,20,10,1,1)	LRN	ERR1516153
19536_2#66	3290	2010	ENI 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN	ERR1516154
19536_2#67	1181	2012	ENI 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	LRN	ERR1516155
19536_2#68	815	2010	ENI 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	LRN	ERR1516156
19536_2#69	450	2012	ENI 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN	ERR1516157
19536_2#7	9334	2008	EAEPOC 31/ST1766 (1,5,29,1,46,14,18)	IDIBELL	ERR1516095
19536_2#70	2442	2010	ENI 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN	ERR1516158
19536_2#71	234HT	-	tipo EPOC 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	LRN	ERR1516159
19536_2#72	1571HT	-	tipo EPOC 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	LRN	ERR1516160
19536_2#73	1722HT	-	tipo EPOC 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	LRN	ERR1516161
19536_2#74	414HT	-	tipo EPOC 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	LRN	ERR1516162
19536_2#75	1089HT	-	tipo EPOC 16F/ST30* (1,5,27,20,10,1,1)	LRN	ERR1516163
19536_2#76	3290HT	-	tipo EPOC 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN	ERR1516164
19536_2#77	1181HT	-	tipo EPOC 16F/ST30 (1,5,27,20,1,1,1)	LRN	ERR1516165
19536_2#78	815HT	-	tipo EPOC 11A/ST62 (2,5,29,12,16,3,14)	LRN	ERR1516166
19536_2#79	450HT	-	tipo EPOC 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN	ERR1516167
19536_2#8	9401	2008	EAEPOC 22F/ST433 (1,1,4,1,18,58,17)	IDIBELL	ERR1516096
19536_2#80	2442HT	-	tipo EPOC 11A/ST6521 (8,11,10,1,6,8,90)	LRN	ERR1516168
19536_2#9	9589	2009	EAEPOC 33F/ST717 (5,35,29,1,45,39,18)	IDIBELL	ERR1516097
13681_1#12	-	2013	PS 23B/ST439	Sanger	-
13681_1#16	-	2013	PS 6C/ST1714	Sanger	-
13681_1#18	-	2013	PS 24F/ST72	Sanger	-
13681_1#22	-	2013	PS 31/ST9655	Sanger	-

## MATERIALES Y MÉTODOS

13681_1#23	-	2013	PS 10A/ST816	Sanger	-
13681_1#25	-	2013	PS 11A/ST62	Sanger	-
13681_1#27	-	2013	PS 15A/ST63	Sanger	-
13681_1#28	-	2013	PS 34/ST11796	Sanger	-
13681_1#29	-	2013	PS 21/ST1877	Sanger	-
13681_1#30	-	2013	PS 15B/ST1262	Sanger	-
13681_1#33	-	2013	PS 35B/ST452	Sanger	-
13681_1#34	-	2013	PS 35B/ST198	Sanger	-
13681_1#36	-	2013	PS 24B/ST162	Sanger	-
13681_1#41	-	2013	PS 15A/ST58	Sanger	-
13681_1#42	-	2013	PS 24F/ST177	Sanger	-
13681_1#43	-	2013	PS 33F/ST673	Sanger	-
13681_1#45	-	2013	PS 6C/ST1692	Sanger	-
13681_1#48	-	2013	PS 10A/ST449	Sanger	-
13681_1#49	-	2013	PS 15B/ST411	Sanger	-
13681_1#53	-	2013	PS 15B/ST199	Sanger	-
13681_1#9	-	2013	PS 23A/ST438	Sanger	-
13681_2#2	-	2013	PS 16F/ST414	Sanger	-
13681_2#20	-	2013	PS 10A/ST2068	Sanger	-
13681_2#21	-	2013	PS 15B/ST11797	Sanger	-
13681_2#24	-	2013	PS 15B/ST448	Sanger	-
13681_2#3	-	2013	PS 6C/ST11213	Sanger	-
13681_2#38	-	2013	PS 35F/ST446	Sanger	-
13681_2#4	-	2013	PS 15B/ST2220	Sanger	-
13681_2#5	-	2013	PS 6A/ST65	Sanger	-
13682_1#1	-	2012	PS 22F/ST433	Sanger	-
13682_1#33	-	2012	PS 3/ST180	Sanger	-
13682_1#54	-	2012	PS 21/ST193	Sanger	-
13682_1#78	-	2013	PS 35F/ST11798	Sanger	-
13682_1#79	-	2013	PS 16F/ST30	Sanger	-
13682_1#81	-	2013	PS 15A/ST6733	Sanger	-
13682_1#88	-	2013	PS 15A/ST1591	Sanger	-
13682_1#9	-	2012	PS 15B/ST11799	Sanger	-
13682_1#93	-	2013	PS 38/ST393	Sanger	-
13682_2#2	-	2012	PS 10A/ST461	Sanger	-
13682_2#20	-	2012	PS 7F/ST191	Sanger	-
13682_2#23	-	2012	PS 31/ST11800	Sanger	-
13682_2#26	-	2012	PS 31/ST1766	Sanger	-
13682_2#47	-	2012	PS 34/ST547	Sanger	-
13682_2#73	-	2012	PS 15A/ST2613	Sanger	-
14937_1#25	-	2012	PS 23A/ST42	Sanger	-
15682_5#45	-	2005	ENI 35F/ST3763	Sanger	-
15682_5#46	-	2006	ENI 19A/ST2464	Sanger	-
15682_5#50	-	2004	ENI 18/ST1255	Sanger	-

15682_5#56	-	2004	ENI 14/ST1864	Sanger	-
15682_5#57	-	2004	ENI 6C/ST3513	Sanger	-
15682_5#67	-	2005	ENI 1/ST304	Sanger	-
15682_5#76	-	2005	ENI 4/ST246	Sanger	-
15682_5#80	-	2005	ENI NT/ST24	Sanger	-
15682_5#81	-	2005	ENI NT/ST218	Sanger	-
15682_6#17	-	2006	ENI NT/ST638	Sanger	-
15682_6#18	-	2006	ENI NT/ST2495	Sanger	-
15682_6#35	-	2006	ENI 6/ST3728	Sanger	-
15682_6#44	-	2006	ENI NT/ST207	Sanger	-
15682_6#51	-	2006	ENI 8/ST944	Sanger	-
15682_6#58	-	2006	ENI 6/ST1640	Sanger	-
15682_6#70	-	2007	ENI 6/ST3241	Sanger	-
15682_6#78	-	2007	ENI 8/ST404	Sanger	-
15682_6#8	-	2005	ENI NT/ST5453	Sanger	-
15682_6#90	-	2008	ENI NT/ST228	Sanger	-
15682_7#10	-	2008	ENI 9N/9L/ST834	Sanger	-
15682_7#12	-	2008	ENI NT/ST3412	Sanger	-
15682_7#19	-	2008	ENI 34/ST1644	Sanger	-
15682_7#31	-	2008	ENI 7C/7B/ST2481	Sanger	-
15682_7#37	-	2008	ENI 19A/ST450	Sanger	-
15682_7#46	-	2009	ENI 9/ST156	Sanger	-
15682_7#53	-	2009	ENI 31/ST7855	Sanger	-
15682_7#62	-	2009	ENI 19A/ST667	Sanger	-
15682_8#16	-	2010	ENI 19F/ST8025	Sanger	-
15682_8#27	-	2011	ENI NT/ST994	Sanger	-
15682_8#29	-	2011	ENI 23A/ST11191	Sanger	-
15682_8#31	-	2011	ENI 4/ST206	Sanger	-
15682_8#34	-	2011	ENI 19F/ST424	Sanger	-
15682_8#42	-	2011	ENI 22F/ST455	Sanger	-
15682_8#69	-	2013	ENI 3/ST260	Sanger	-
15682_8#8	-	2010	ENI 19F/ST251	Sanger	-
16043_2#46	-	-	ENI 1/ST612	Sanger	-
6470_3#10	-	2006	PS 10A/ST1497	Sanger	-
6470_3#12	-	2006	PS 6A/ST3240	Sanger	-
6470_3#14	-	2006	PS 17F/ST392	Sanger	-
6470_3#15	-	2006	PS 23F/ST36	Sanger	-
6470_3#17	-	2006	PS 6B/ST469	Sanger	-
6470_3#19	-	2006	PS 9N/ST405	Sanger	-
6470_3#21	-	2006	PS 6B/ST176	Sanger	-
6470_3#23	-	2006	PS 38/ST310	Sanger	-
6470_3#24	-	2006	PS 14/ST15	Sanger	-
6470_3#5	-	2006	PS 23F/ST3411	Sanger	-
6470_3#6	-	2006	PS 31/ST444	Sanger	-

## MATERIALES Y MÉTODOS

6470_3#8	-	2006	PS 6B/ST2496	Sanger	-
6470_3#9	-	2006	PS 6B/ST2457	Sanger	-
6470_4#14	-	2006	PS 6B/ST402	Sanger	-
6470_4#16	-	2006	PS 4/ST205	Sanger	-
6470_4#18	-	2007	PS 6B/ST138	Sanger	-
6470_4#19	-	2007	PS 14/ST9	Sanger	-
6470_4#2	-	2006	PS 23F/ST311	Sanger	-
6470_4#20	-	2007	PS 22F/ST698	Sanger	-
6470_4#21	-	2007	PS 19F/ST309	Sanger	-
6470_4#4	-	2006	PS 23F/ST33	Sanger	-
6470_4#9	-	2006	PS 15C/ST4018	Sanger	-
6470_5#12	-	2007	PS 23A/ST190	Sanger	-
6470_5#13	-	2007	PS 6A/ST327	Sanger	-
6470_5#22	-	2007	PS 14/ST124	Sanger	-
6470_5#9	-	2007	PS 19A/ST276	Sanger	-
6470_6#16	-	2002	PS 6A/ST1862	Sanger	-
6470_6#17	-	2002	PS 16F/ST2042	Sanger	-
6470_6#2	-	2007	PS 34/ST1884	Sanger	-
6470_6#20	-	2007	PS 19F/ST422	Sanger	-
6472_5#13	-	2007	PS 33F/ST100	Sanger	-
6472_5#14	-	2007	PS 22F/ST819	Sanger	-
6472_5#18	-	2007	PS 11A/ST4019	Sanger	-
6472_5#19	-	2007	PS 6D/ST3460	Sanger	-
6472_5#2	-	2007	PS 19F/ST179	Sanger	-
6472_6#3	-	2007	PS 19A/ST1201	Sanger	-
6472_6#7	-	2008	PS 6B/ST4020	Sanger	-
6472_7#1	-	2008	PS 19F/ST4696	Sanger	-
6472_7#17	-	2008	PS 31/ST568	Sanger	-
6472_7#19	-	2008	PS 7C/ST1797	Sanger	-
6472_8#17	-	2008	PS 6B/ST242	Sanger	-
6472_8#19	-	2008	PS 6A/ST460	Sanger	-
6472_8#21	-	2008	PS 21/ST4021	Sanger	-
6472_8#23	-	2008	PS 6C/ST398	Sanger	-
6472_8#4	-	2008	PS 23F/ST2631	Sanger	-
6486_5#12	-	2010	PS 9N/ST66	Sanger	-
6486_5#22	-	2010	PS 23B/ST1373	Sanger	-
6486_5#7	-	2010	PS 34/ST8027	Sanger	-
6486_6#15	-	2010	PS 19A/ST416	Sanger	-
6486_6#18	-	2010	PS 17F/ST6189	Sanger	-
6486_6#22	-	2010	PS 6A/ST1876	Sanger	-
6486_7#10	-	2010	PS 35F/ST8604	Sanger	-
6486_7#11	-	2010	PS 15A/ST73	Sanger	-
6486_7#19	-	2010	PS 21/ST432	Sanger	-
6486_7#4	-	2010	PS 6C/ST8028	Sanger	-

6486_7#9	-	2010	PS 15C/ST8711	Sanger	-
6486_8#13	-	2011	PS 11A/ST9137	Sanger	-
6486_8#15	-	2011	PS 1/ST227	Sanger	-
6486_8#16	-	2011	PS 33F/ST3916	Sanger	-
6486_8#22	-	2011	PS 6C/ST9685	Sanger	-
6486_8#3	-	2011	PS 20/ST235	Sanger	-
6486_8#9	-	2011	PS 19A/ST482	Sanger	-
6512_1#12	-	2008	PS 6C/ST1600	Sanger	-
6512_1#14	-	2008	PS 9V/ST4424	Sanger	-
6512_1#15	-	2008	PS 6C/ST1150	Sanger	-
6512_2#10	-	2009	PS 33D/ST4697	Sanger	-
6512_2#20	-	2009	PS 6C/ST395	Sanger	-
6512_3#9	-	2009	PS 1/ST306	Sanger	-
6512_4#18	-	2009	PS 10A/ST97	Sanger	-
6512_4#21	-	2009	PS 23A/ST992	Sanger	-
6512_5#1	-	2009	PS 22F/ST3734	Sanger	-
6512_5#15	-	2009	PS 19A/ST172	Sanger	-
6512_5#21	-	2009	PS 23F/ST81	Sanger	-
6512_5#9	-	2009	PS 15C/ST8917	Sanger	-
6512_6#10	-	2009	PS 8/ST53	Sanger	-
6512_6#15	-	2009	PS 15A/ST410	Sanger	-
6512_6#17	-	2009	PS 20/ST6188	Sanger	-
6512_6#20	-	2009	PS NT/ST8710	Sanger	-
6512_6#4	-	2009	PS NT/ST8709	Sanger	-
6512_6#8	-	2009	PS 15C/ST6187	Sanger	-
6512_7#20	-	2010	PS 21/ST6190	Sanger	-
6512_7#22	-	2010	PS 18C/ST113	Sanger	-
6512_7#9	-	2010	PS 22F/ST4325	Sanger	-
6569_7#18	-	2011	PS 33F/ST1012	Sanger	-
6569_7#2	-	2011	PS 35F/ST7004	Sanger	-
6569_7#3	-	2011	PS 12F/ST8060	Sanger	-
6569_7#9	-	2011	PS 6C/ST4581	Sanger	-
6569_8#19	-	2011	PS 6C/ST1390	Sanger	-
6569_8#5	-	2010	PS 15B/ST8712	Sanger	-
6570_1#10	-	2011	PS 21/ST4321	Sanger	-
6570_1#12	-	2011	PS 35F/ST1635	Sanger	-
6570_1#2	-	2011	PS 23A/ST8029	Sanger	-
6593_2#19	-	2008	PS 23B/ST4423	Sanger	-

<sup>a</sup> Año del aislamiento.

<sup>b</sup> EAEPOC, exacerbación aguda en un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica; ENI, enfermedad neumocócica invasiva; PS, portador sano; ST, secuencitipo; \*, significa que es un nuevo secuencitipo similar al indicado.

<sup>c</sup> IDIBEL, Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona). Estas cepas fueron cedidas por las Dras. J. Liñares y C. Ardanuy; LRN, Laboratorio de Referencia de Neumococo del Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III, Madrid); Sanger, The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Inglaterra.

**Tabla 6.** Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Localización
LA 5'ext	<sup>a</sup> ggtctagAGCTTTTTAGTCTGGGGTG	1723225–1723207 (R6/c)
LA 3'ext	<sup>a</sup> gggatccAAGCTTTTTCAAGACCTAATAATATG	1722013–1722037 (R6)
	PCR <i>in silico</i>	
LytA-1	TTATTTTACTGTAATCAAGCCAT	
LytA-2	ATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGA	
Pce-1	GGCTGTAAGTCTAAAGGGAAG	830669-830690 (R6)
Pce-2	ATCAGCAATCTTAGTCGGACGC	833174-833153 (R6/c)
Ply-1	CGCAGAGAGATCATCGCCTC	1713881–1713901 (R6)
Ply-2	TCCTGGATTGAGTTGCATAA	1715361–1715381 (R6/c)
	MLST	
AroE-up	GCCTTTGAGGCGACAGC	
AroE-dn	TGCAGTTCAGAAAACATATTTCTAA	
Gdh-up	ATGGACAAACCACGATCAGCTTT	
Gdh-dn	GCTTGAGGTCCCATGACTGATCCC	
Gki-up	GGCATTGGAATGGGATCACC	
Gki-dn	TCTCCCGCAGCTGACAC	
RecP-up	GCCAACTCAGGTCATCCAGG	
RecP-dn	TGCAACCGTAGCATTGTAAC	
Spi-up	TTATTCCTCCTGATTCTGTC	
Spi-dn	GTGATTGGCCAGAAGCGGAA	
Xpt-up	TTATTAGAAGAGCGCATCCT	
Xpt-dn	AGATCTGCCTCCTTAAATAC	
Ddl-up	TGCCTCAAGTTCCTTATGTGG	
Ddl-dn	CACTGGGTGAAAACCATGGCAT	

<sup>a</sup> En minúscula, nucleótidos introducidos para crear sitios de restricción artificiales.

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

<sup>c</sup> Abreviaturas: LA, NAM-amidasa LytA; Pce, fosforilcolin esterasa; Ply, neumolisina; *aroE* (shikimate dehidrogenasa); *gdh* (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa); *gki* (glucosa kinasa); *recP* (transcetolasa); *spi* (péptido señal I); *xpt* (xanthine fosforiltransferasa); *ddl* (D-alanina-D-alanina ligasa).

## 1.2. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *S. pneumoniae* se cultivaron en medio Todd-Hewitt (Oxoid, Inglaterra) conteniendo extracto de levadura al 0.5% (THY) o en placas de agar de soja tripticaseína o Agar D (dextrosa, 1 g l<sup>-1</sup>; NaCl, 5 g l<sup>-1</sup>; neopeptona, 5 g l<sup>-1</sup>; Tris base, 1.25 g l<sup>-1</sup>; extracto de levadura 1.25 g l<sup>-1</sup>; casitona, 10 g l<sup>-1</sup>) conteniendo 5% de sangre desfibrinada de carnero (Oxoid). Ocasionalmente, se utilizó el medio C ajustado a pH 8.0 (CpH8) (Lacks y Hotchkiss, 1960) conteniendo (C+Y) o no extracto de levadura (Difco) (0.08%). Las cepas se conservaron congeladas a –80°C en los diferentes medios de cultivo empleados, a los que se añadió glicerol al 10% (v/v) (concentración final). En el momento de sembrarlos, los cultivos bacterianos se descongelaron e incubaron en los medios correspondientes a 37°C sin agitación. A menos que se indique lo contrario, la multiplicación de los cultivos de neumococo se siguió por densidad óptica a 550 nm (DO<sub>550</sub>) con un espectrofotómetro Thermo Scientific Genesys 20. Para el estudio del impacto del HT, los

diferentes medios de cultivo fueron adicionados con EHT diluido al 1 y 5%, obtenido en el laboratorio según metodología que se describirá más adelante (véase Apto. 1.6 de Materiales y Métodos).

### 1.3. Reactivos y productos

Los componentes de los medios de cultivo fueron suministrados por las casas comerciales Difco, Oxoid, Pronadisa, Lonza, Sigma-Aldrich, Merck y Becton Dickinson. La agarosa fue suministrada por Pronadisa. Se ha empleado la seroalbúmina bovina (BSA) de Merck, que se preparó al 10% en agua a pH 7.5, el paraformaldehído (PFA) y el azul tripán que fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Al igual que la RNAsa, los antibióticos cloranfenicol (CHL), eritromicina (ERY), amoxicilina (AMX), penicilina (PEN), CTX y CRO se compraron a Sigma-Aldrich.

La catalasa fue suministrada por la casa Boehringer Mannheim y la proteinasa K por Roche. Los péptidos estimulantes de la competencia CSP1 (EMRLSKFFRDFILQRKK) (Håvarstein *et al.*, 1995) y CSP2 (EMRISRILDFLFLRKK) (Coleman *et al.*, 2011) fueron sintetizados por el Servicio de Química de Proteínas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Los fluorocromos y anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla 7.

Los medios utilizados para los cultivos celulares fueron suministrados por Lonza. El HBSS (tampón salino de Hank) con o sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , que se empleó para el lavado de las células, y el RPMI-1640 con o sin rojo fenol que se suplementó, cuando se indique, con Gln y PEN-estreptomina, también suministrados por Lonza.

**Tabla 7.** Anticuerpos y fluorocromos utilizados.

Compuesto	Descripción <sup>a</sup>	Excitación/ Emisión (nm)	Fabricante
Anticuerpo secundario A	Anti-ratón IgG conjugado con FITC (conejo)	495/519	Southern Biotech
Anticuerpo secundario B	Anti-conejo IgG conjugado con FITC (cabra)	495/519	Southern Biotech
Anticuerpo secundario C	Anti-ratón IgG conjugado con Rojo Texas (cabra)	589/615	AbD Serotec
Anticuerpo secundario D	Anti-rata IgG conjugado con TRITC (cabra)	495/519	Southern Biotech
Control isotipo A	Normal ratón IgG		Santa Cruz Biotechnology
Control isotipo B	Normal conejo IgG		Santa Cruz Biotechnology
C3b-FITC	Anti-C3b humano conjugado con FITC (cabra)	495/519	Cappel (MP Biomedicals)
C4BP	Anti-C4BP humano (oveja)		AbD Serotec
FH	Anti-factor H humano (oveja)		AbD Serotec
CRP	Anti-CRP humana (conejo)		Calbiochem
C1q-FITC	Anti-C1q humano conjugado con FITC (conejo)	495/519	AbD Serotec
IgA, Kappa (mieloma)	Anti-fosforilcolina. Clon TEPC15 (ratón)		AbD Serotec
BEAR1	Anti-CD11b (conejo)		Cedido por C. Bernabéu
Rodamina/Faloidina	Colorante de actina-F	554/573	Invitrogen. Molecular Probes
Hoechst 33342	Colorante fluorescente de DNA	350/461	AnaSpec
PAFr	Anti-PAFr humano (ratón)		Cayman
PAFr	Anti-PAFr humano (conejo)		Santa Cruz Biotechnology
TLR4	Anti-TLR4 humano IgG (ratón)		Santa Cruz Biotechnology
Pce	Anticuerpo policlonal frente a Pce (conejo)		CIB-CSIC
LytA	Anticuerpo policlonal frente a LytA (conejo)		CIB-CSIC
GyrA	Anticuerpo frente a la subunidad GyrA de la DNA girasa		Cedido por A. de la Campa
KPL-1	Anti-PSGL-1 humano (ratón)		NBL
Anti-Fc $\gamma$ RII	Anti-CD32 monoclonal humano (ratón) conjugado con FITC		Dakocytomation
Hoechst 33342	Colorante fluorescente de DNA	350/461	AnaSec
Rodamina/Faloidina	Colorante de actina-F	554/573	Invitrogen. Molecular Probes
BacLight	Kít 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	Invitrogen. Molecular Probes

## MATERIALES Y MÉTODOS

ADAM8	Anti-ADAM8 de ratón conjugado con FITC		Cedido por A. Urzainqui
PSGL-1	Anti-CD162 de ratón (en rata) con BV510		Cedido por A. Urzainqui
APC	Ani-CD45R/B220 de ratón (en rata) con APC		Cedido por A. Urzainqui
CD49b	Anti CD49b con APC-Vio770		Cedido por A. Urzainqui
CD4	Anti-CD4 de ratón con PE		Cedido por A. Urzainqui
CD8	Anti-CD8 de ratón con PerCP	482/678	Cedido por A. Urzainqui
CD11b	Anti-CD11b de ratón conjugado con FITC		Cedido por A. Urzainqui
CD11c	Anti -CD11c de ratón (rata) con PE-Cy7	496/785	Cedido por A. Urzainqui
CD45	Anti-CD45 con BV421		Cedido por A. Urzainqui

<sup>a</sup> La especie animal en la que se obtuvieron los anticuerpos se indica entre paréntesis.

FITC, isotiocianato de fluoresceína.; TRITC, isotiocianato de tetrametil-rodamina; PE, ficoeritrina; APC, alofocianina; PerCP, proteína clorofila peridina-cianina; BV, violeta brillante.

### 1.4. Estudios de susceptibilidad antibiótica

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de PEN, AMX y CTX/CRO en las cepas clínicas del serotipo 11A (Tabla 3) se determinó por la técnica de dilución en agar (Fenoll *et al.*, 1991), de acuerdo con los criterios del Instituto de Estándares del Laboratorio Clínico (CLSI), incluyendo la cepa ATCC 49619 de *S. pneumoniae* adquirida de la *American Type Culture Collection* (ATCC), y otros seis aislados clínicos como controles de calidad. Los estudios de susceptibilidad antibiótica fueron repetidos un mínimo de tres veces para cada cepa (Fenoll *et al.*, 2009).

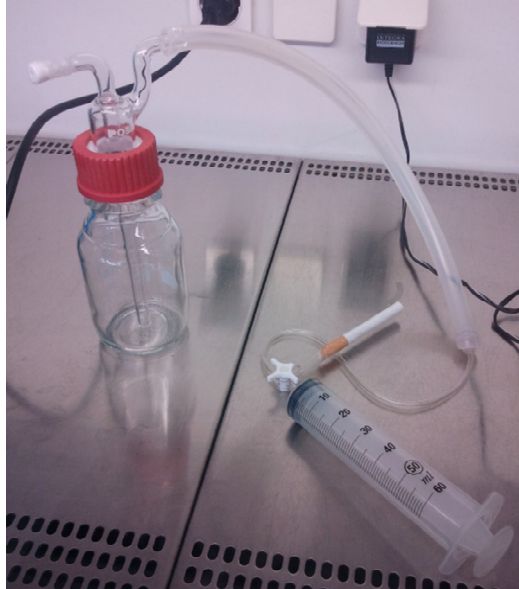
### 1.5. Obtención de suero humano

Las muestras de suero proceden de voluntarios sanos (media de edad, 35 años), no vacunados frente a *S. pneumoniae* y se obtuvieron de acuerdo con las directrices institucionales. Una vez obtenida la sangre, se centrifugó a 5000 x g durante 10 min con el fin de separar el suero y ser almacenado a -80°C en alícuotas.

### 1.6. Obtención de extracto de humo de tabaco

El EHT se preparó a partir de cigarrillos para investigación (*Research cigarettes*) producidos por la Universidad de Kentucky en EE.UU. conteniendo 0.73 mg de nicotina, 9.4 mg de alquitrán y 12 mg de CO que es equivalente al contenido de cigarrillos comerciales como Marlboro® (0.8 mg de nicotina, 10 mg de alquitrán y 120 mg de CO), que es la marca líder de cigarrillos en España (<http://www.cmtabacos.es/wwwcmt/paginas/ES/mercadoEstadisticas.tmp>). Para ello, los cigarrillos se consumieron usando un dispositivo desarrollado durante esta Tesis Doctoral modificado ligeramente del descrito por otros autores (Martí-Lliteras *et al.*, 2009). El dispositivo utilizado se basa en una jeringa modificada, la cual dirige el humo dentro de un frasco lavador de gases estéril que contiene RMPI-1640 sin rojo fenol sin suplementar (5 ml de medio de cultivo por cada cigarrillo) (Fig. 8). La jeringa, a través de su conexión con una válvula de tres vías, es capaz de extraer el HT y ponerlo en contacto con el medio de cultivo. Se añadieron 40 ml de HT, cada vez, al interior del frasco lavador y se agitó vigorosamente de manera continuada con periodos de descanso de 10 s. Este proceso se repitió cinco veces por cigarrillo (Taylor, 2010) y, finalmente, se filtró con un filtro de 0.22 µm de diámetro de poro (Millipore). El EHT obtenido fue

el resultado de la combustión, cada vez, de 8 cigarrillos comerciales que fue designada como solución de EHT al 100%. Se conservaron congeladas alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Fig. 8. Dispositivo empleado en esta Tesis Doctoral para la extracción de extracto de humo de tabaco.** La jeringa, a través de su conexión con una válvula de tres vías, es capaz de extraer el HT y ponerlo en contacto, a través de unos tubos de goma estériles, con el medio de cultivo que se encuentra en el interior del frasco lavador de gases.

### 1.7. Curva de crecimiento

Para el estudio de la actividad lítica de la NAM-amidasa *LytA* entre los diferentes aislados objeto de estudio, se investigó la curva de crecimiento bacteriana. Para ello, se partió de un cultivo incubado toda la noche en medio C+Y y, cuando éste alcanzó una  $\text{DO}_{620}$  de 0.6, se hizo una dilución 1/100 en un volumen final de 1 ml. El control del crecimiento se realizó en placas de 24 pocillos (Falcon) a  $37^{\circ}\text{C}$ , con una agitación orbital de 5 s y 5 mm de amplitud en cada lectura. Se monitorizó mediante el uso del equipo Infinite® 200 PRO series y se empleó el programa TECAN I-CONTROL para la recepción de datos.

## 2. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES ISOGÉNICOS

### 2.1. Transformación genética

Los mutantes empleados se obtuvieron mediante la técnica de mutagénesis *Mariner* descrita anteriormente (Moscoso y Claverys, 2004). La transformación genética se hizo a partir de mutantes *lytA* y *pce* previamente construidos en el laboratorio (Moscoso y Claverys, 2004) utilizando la metodología descrita anteriormente (Yuste *et al.*, 2005). Las cepas de *S. pneumoniae* a transformar se crecieron en 15 ml de medio THY a pH 6.8 hasta alcanzar una  $\text{DO}_{580}$  de 0.015. Con el fin de detener el crecimiento bacteriano, el cultivo se puso en hielo y se

centrifugó a  $5000 \times g$  utilizando un rotor SS-34 durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Del volumen de partida, se emplearon 12 ml para la transformación del DNA, mientras que el resto se usó como control negativo. Una vez centrifugados, el sedimento se llevó a un volumen de 1 ml en THY a pH 8 conteniendo  $\text{CaCl}_2$  1 mM y 0.2% de BSA. Para la transformación de *S. pneumoniae* se añadió CSP1 ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y CSP2 ( $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ); y se incubaron durante 5 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se añadieron 5  $\mu\text{l}$  del DNA donador a un mínimo de 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana y la mezcla se incubó 2 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se sembraron las diluciones apropiadas de la mezcla de transformación en placas de agar sangre con el correspondiente antibiótico y se incubaron durante toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$  para permitir la expresión fenotípica y posterior selección de los transformantes.

### 3. TÉCNICAS DE DNA

#### 3.1. Preparación del DNA cromosómico para determinar el genotipo de los aislados clínicos mediante MLST y para la construcción de los diferentes mutantes del estudio

El DNA cromosómico de *S. pneumoniae* se preparó utilizando el kit *Wizard Promega*, según las indicaciones del fabricante, con algunas modificaciones. Para ello, 10 ml de las células de un cultivo en THY ( $\text{DO}_{550} = 0.6\text{--}0.7$ ) se sedimentaron por centrifugación a  $10000 \times g$ , utilizando un rotor SS-34 durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los cultivos se resuspendieron en 50 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de una solución de Doc al 1% y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. En el caso de mutantes *lytA*, se añadieron 10  $\mu\text{g}$  de la proteína LytA de forma exógena y se incubaron durante 25 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . En el caso de los cultivos silvestres que tenían LytA, el sedimento del mismo se resuspendió en EDTA y Doc directamente. Después, se añadieron 0.2 ml de EDTA, 0.3 ml de tampón de lisis y se incubó a  $80^{\circ}\text{C}$  hasta la lisis del cultivo. Una vez lisados, se les añadió RNasa ( $100 \text{mg ml}^{-1}$ ), se incubaron durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  y, posteriormente, se les añadió 0.1 ml de una solución de precipitación de proteínas continuándose la incubación durante 5 min en hielo. A continuación, se centrifugó durante 6 min a  $16100 \times g$ . Para precipitar el DNA, se pasó la fase acuosa a un tubo limpio y las proteínas restantes se eliminaron mediante un tratamiento con 0.6 ml de isopropanol, centrifugándose a  $16100 \times g$  durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 0.1 volúmenes de acetato potásico 3 M, pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol absoluto. Para eliminar las sales que pudieran haber co-precipitado con el DNA, se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó de nuevo a  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min. El DNA sedimentado se dejó secar al aire para la eliminación completa del etanol de la muestra y se resuspendió en tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA).

#### 3.2. Preparación del DNA para secuenciación de genoma completo

El DNA cromosómico empleado para la secuenciación masiva se preparó utilizando el kit de extracción *DNA qiagen EN-DNeasy® Blood & Tissue* siguiendo las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. El sedimento del cultivo se resuspendió en 0.2 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 30 mM EDTA, 0.4% Sarkosyl y 0.1% Triton X-100) (Morrison, 1978), y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  hasta la lisis del cultivo. A los cultivos lisados se les añadió 50  $\mu\text{l}$  de tampón AL (qiagen) y 20  $\mu\text{l}$  de proteinasa K. A continuación, se incubaron 1 h a  $56^{\circ}\text{C}$ . Para la lisis total y

eliminación de las proteínas restantes, una vez transcurrido ese tiempo, se añadieron 150  $\mu\text{l}$  adicionales del tampón AL. Finalmente, los cultivos lisados se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente y el DNA se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de tampón de elución. Para la cuantificación del DNA cromosómico se empleó el kit *QuantiFluor® ONE dsDNA System* (Promega), según las instrucciones del fabricante. Todas las muestras estaban libres de RNA libre en una concentración mayor a 1  $\mu\text{g}$  y se encontraban en un rango de concentración entre 20  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$  y 150  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ .

### 3.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Se utilizaron geles de agarosa al 0.7 o 1.5% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 2 mM, pH 8.1), utilizando el mismo tampón para el desarrollo de la electroforesis. A las muestras se les añadió 1/4 de su volumen de una solución compuesta por Ficoll 400 al 30% (p/v), azul de bromofenol al 0.2% (p/v), xilencianol al 0.2% y EDTA 40 mM (pH 8.0). La electroforesis se llevó a cabo a 100–150 V durante 60–90 min y, una vez finalizada, los geles se tiñeron con GelRed (Biotium) y los fragmentos de DNA se visualizaron con radiación ultravioleta. Como marcadores de tamaño molecular se utilizaron, según los casos, Lambda DNA HindIII (BioLabs), el DNA del fago digerido con BstEII (Amersham) y la forma replicativa del DNA del fago  $\phi\text{X174}$  digerida con HaeIII.

### 3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para llevar a cabo la amplificación de fragmentos de DNA se empleó un equipo *GeneAmp® PCR System 2700* de Thermo Fisher y las enzimas *Taq polimerasa* (Biotools) o *Phusion®* (BioLabs©) 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).

### 3.5. Secuenciación de ADN

La secuenciación del gen *lytA* de los aislados del serotipo 11A se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo *Abi Prism 3700 TM* (Applied Biosystems). Para la reacción de secuenciación se utilizó el *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* de Applied Biosystems, y la DNA polimerasa *AmpliTaQ FS*, siguiendo las recomendaciones de los suministradores. Las reacciones se llevaron a cabo mediante la técnica de PCR con un termociclador *GeneAmp® PCR System 2400* de Perkin-Elmer y fue llevada a cabo por Secugen. La secuenciación del genoma completo de los aislados clínicos descritos en la Tabla 5 se realizó por el Instituto Wellcome Trust Sanger utilizando un secuenciador Illumina HiSeq.

### 3.6. Serotipificación y tipificación molecular

Los aislados se serotipificaron por la reacción de Quellung, ensayos *dot blot* (Fenoll *et al.*, 1997) y/o PCR a tiempo real (Tarragó *et al.*, 2008) con el fin de detectar la frecuencia de aislados de neumococo capaces de expresar el serotipo 11A. La caracterización molecular de los aislados

de este serotipo se realizó mediante electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y MLST, siguiendo los criterios que se describen a continuación. Para el análisis de PFGE, los fragmentos fueron separados mediante el sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad) como se ha descrito anteriormente (Ardanuy *et al.*, 2014). Los patrones de PFGE se compararon de manera visual con los clones representativos internacionalmente a través de la aplicación “*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*” (<http://www.sph.emory.edu/PMEN>). Los números de los alelos y el ST se asignaron usando la página web MLST para neumococo (<http://spneumoniae.mlst.net>). Se emplearon varios criterios para la tipificación molecular. Como el serotipo 11A en España se ha asociado con el ST62, susceptible a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, se seleccionaron, de manera aleatoria, 70 aislados susceptibles mediante PFGE/MLST, con el fin de confirmar sus genotipos. Por otro lado, todos los neumococos invasivos de dicho serotipo que presentaban una susceptibilidad disminuida a  $\beta$ -lactámicos ( $n = 45$ ) se genotipificaron mediante PFGE. Dado que todos los aislados de neumococo PEN-R presentaron el mismo patrón de PFGE, se seleccionaron 5 aislados a los que se les realizó tipificación mediante MLST y el resto de aislados se usaron para secuenciar los genes *aroE* y *ddl*, una vez se supo que las diferencias entre los STs resistentes en comparación al ST156 se encontraban únicamente en esos genes. Con estos criterios, se asumió que los aislados con el mismo patrón de PFGE, idénticos perfiles en las PBPs y los mismos alelos *aroE* y/o *ddl* presentaban el mismo ST.

Para el resto de cepas que se han empleado en esta Tesis Doctoral pertenecientes a los serotipos 11A y 16F, el ST se determinó mediante PCR, empleando para ello los 7 pares de oligonucleótidos del MLST que lo definen (Enright y Spratt, 1999) (Tabla 6). Los serotipos y STs fueron comprobados posteriormente, tras la secuenciación del genoma completo de las cepas, mediante la herramienta bioinformática GETMLST.PY.

### 3.7. Determinación de las PBPs

Los perfiles de *pbp1A*, *pbp2X* y *pbp2B* de los aislados del serotipo 11A resistentes a  $\beta$ -lactámicos se determinaron por PCR, analizando los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), siguiendo metodología descrita previamente (Ardanuy *et al.*, 2014). En primer lugar, el perfil teórico de restricción de las PBPs de la cepa R6 de *S. pneumoniae* PEN-S, la cepa ATCC 700671 (Spain<sup>9V</sup>-ST156) y la cepa AP200 (ST62) se realizó *in silico* mediante el uso de la herramienta informática NEB CUTTER V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>). La diferenciación de las secuencias de los tres aislados de *S. pneumoniae* se hizo mediante la digestión con la enzima HinfI. A continuación, los patrones de RFLP obtenidos para cada aislado del serotipo 11A resistente a  $\beta$ -lactámicos se visualizaron de manera comparada con los obtenidos para las cepas control, Spain<sup>9V</sup>-ST156 y el aislado clínico HUB0926 del serotipo 11A (ST62). Además, se seleccionaron, al menos, dos aislados pertenecientes a cada ST para la secuenciación de las PBPs, siguiendo la metodología ya descrita (Ardanuy *et al.*, 2014).

## 4. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS

Para la determinación de los niveles de expresión de las proteínas LytA y Pce en los aislados de pacientes con EPOC, ENI y aislados tipo EPOC (aislados de pacientes con ENI multiplicados en

presencia de 1% EHT durante 10 pases en cultivos seriados), los cultivos se llevaron a cabo en medio THY hasta alcanzar una  $DO_{620}$  de 0.4, se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en PBS para contener  $10 \text{ U ml}^{-1}$  de proteína. Las suspensiones bacterianas se sometieron a un pulso de sonicación de 20 s y se mantuvieron entre  $0-4^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 4.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS

La electroforesis analítica del lisado celular se realizó utilizando los geles comerciales *Any KD™ Criterion™ TGX* (BioRad). Las muestras se hirvieron durante 5 min en presencia de tampón de rotura (Tris-HCl 0.3 mM, pH 6.8; SDS al 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.5 M, glicerol al 50% y azul de bromofenol al 0.05%). La electroforesis se realizó a temperatura ambiente y a 200 V, utilizando un tampón que contenía Tris-HCl 25 mM, Gly 192 mM y SDS al 0.1%. Como marcador de peso molecular se empleó el reactivo *Precision Plus Western C Standards* (BioRad).

#### 4.2. Transferencia a membranas, interacción con anticuerpos y detección

El lisado celular previamente sometido a SDS-PAGE se transfirió a una membrana de nitrocelulosa PVDF,  $0.2 \mu\text{m}$ , de *Trans Blot® turbo™ Transfer Pack* (Thermo Scientific). Para cada gel se utilizó una membrana de transferencia y los diferentes componentes se colocaron a modo de sándwich. Los papeles de filtro se situaron a ambos lados de la membrana, y en el interior se quedaron en contacto el gel y la membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó a 25 V, 1 A durante 30 min con *Trans-Blot Turbo* (BioRad). A continuación, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó cubriéndola con la solución comercial *SuperBlock T20 (TBS)* (Thermo Scientific) durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . En un paso previo a la incubación con el anticuerpo primario, se hicieron tres lavados de la membrana con solución de bloqueo TBST (10 mM Tris pH 7.4, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20) durante 5 min y en agitación ( $20 \times g$ ) a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en *SuperBlock* durante 2 h y leve agitación. Éstos fueron: anti-Pce (cedido por el Dr. Pedro García; CIB-CSIC) diluido 1/100; anti-LytA (cedido por el Prof. Ernesto García; CIB-CSIC) diluido 1/30000; y anti-GyrA (cedido por la Dra. Adela de la Campa; CNM-ISCI) diluido 1/1000. Se realizaron 3 lavados de 5 min con la solución TBST y las membranas se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario IgG-Peroxidasa (Sigma-Aldrich) diluida 1/80000 en solución *SuperBlock*, protegida de la luz y con leve agitación. Por último, se hicieron 3 lavados de 5 min con la solución TBST y un lavado con TBS (10 mM Tris pH 7.4, 0.9% NaCl). El anticuerpo anti-Pce fue previamente purificado por afinidad usando proteína purificada unida a la membrana de PVDF. La subunidad GyrA de la DNA girasa se utilizó como control de carga.

La detección se realizó utilizando el sistema comercial *Super Signal West Pico chemiluminescent substrate* (Thermo Scientific) que utiliza una reacción de quimioluminiscencia. Las soluciones 1 y 2 se mezclaron a partes iguales, cubriendo cada membrana con 8 ml de la mezcla durante 5 min. La detección de la imagen fue monitorizada con el sistema *ChemIDoc™ MP* (Bio-Rad) y el análisis se procesó con el programa *IMAGE LAB™* (Bio-Rad).

## 5. ENSAYOS DE INTERACCIÓN DE *S. PNEUMONIAE* CON EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

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

Los experimentos de depósito de las moléculas del complemento sobre la superficie de neumococo se realizaron mediante ensayos de citometría de flujo (Brown *et al.*, 2002). Los viales de bacteria congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , se descongelaron y centrifugaron a  $16100 \times g$  durante 8 min, y el sedimento se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de PBS (pH 6.8). El proceso de opsonización consistió en mezclar 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión bacteriana en PBS cuyo contenido era de  $5 \times 10^6$  unidades formadoras de colonias (UFC) con 10  $\mu\text{l}$  de suero humano diluido al 20% en PBS. A continuación, las muestras se incubaron durante 20 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Para eliminar el complemento no unido se realizaron dos lavados con 200  $\mu\text{l}$  de PBS-Tween-20 (0.1%). Para detectar el depósito de las moléculas objeto de estudio en la superficie bacteriana, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  del anticuerpo primario conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o bien del anticuerpo primario sin conjugar, en función del ensayo y disponibilidad comercial. La dilución de los anticuerpos fue de 1/300 en PBS-Tween-20 al 0.1%. El tiempo de incubación fue de 30 min en hielo y oscuridad para el depósito de C3b-FITC, de 2 h en oscuridad a  $37^{\circ}\text{C}$  para C1q, de 1 h en hielo para la detección de CRP, y de 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  para la detección de los factores C4BP y fH. Después de la incubación con los anticuerpos, la suspensión bacteriana se lavó dos veces con 200  $\mu\text{l}$  de PBS-Tween-20 (0.1%) con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo no unido. Finalmente, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de PFA al 3% a temperatura ambiente para fijar la bacteria. Cuando el anticuerpo primario no estaba conjugado con ningún fluorocromo, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de anticuerpo secundario y se incubó durante 30 min en hielo y oscuridad. Como en pasos anteriores, se realizaron de nuevo lavados con PBS-Tween-20 (0.1%) con el fin de eliminar el anticuerpo no unido y, finalmente, se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de PFA al 3%. Se completó el volumen de todas las muestras hasta 200  $\mu\text{l}$  con PBS para su posterior análisis mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS Calibur (BD Bioscience). Se ajustó la concentración bacteriana en función de los parámetros, tamaño y complejidad. Se adquirieron un mínimo de 25000 bacterias para su posterior estudio (Yuste *et al.*, 2005).

Los ensayos se repitieron, al menos, tres veces y los resultados se expresaron como índice de fluorescencia (IF) o como índice relativo de fluorescencia (IFR), donde se analizó la proporción de bacteria positiva para la molécula estudiada y la intensidad de fluorescencia que permite determinar cuántas moléculas se unen por bacteria (Hyams *et al.*, 2010). El IF se utilizó para comparar aislados que no eran del mismo fondo genético y se determinó multiplicando el porcentaje de bacteria positiva, para la molécula estudiada, por la media geométrica de la intensidad de fluorescencia. Por el contrario, el IFR se utilizó para comparar aislados de neumococo que procedían del mismo fondo genético y se determinó de forma similar al IF (multiplicando la proporción de bacteria positiva por la intensidad de fluorescencia) pero normalizando el valor obtenido al 100% del valor de la cepa silvestre o bien de la cepa no expuesta a ningún tratamiento como pudo ser el EHT (Exley *et al.*, 2005). Las bacterias incubadas en PBS, en lugar de suero, fueron incluidas como controles negativos (Yuste *et al.*, 2010).

## 5.2. Cuantificación de fosforilcolina

La PCho de la superficie bacteriana fue detectada mediante el mismo ensayo de citometría de flujo descrito anteriormente para los ensayos de depósito del complemento con ligeras modificaciones. Las bacterias fueron incubadas durante 1 h a 37°C con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCho diluido 1/25 en PBS-Tween-20 (0.1%). A continuación, se incubó durante 30 min en hielo y oscuridad con el anticuerpo secundario anti-ratón IgG conjugado con FITC diluido 1/250 veces en PBS-Tween-20 (0.1%). El resto de metodología incluyendo los lavados para eliminar el exceso de anticuerpo, tanto primario como secundario, no unido está detallado en el apartado 5.1.

Los resultados se expresaron como IF o bien como IFR, siguiendo el mismo criterio que el explicado anteriormente para los componentes del complemento.

## 6. OPSONOFAGOCITOSIS (OP) DE *S. PNEUMONIAE*

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

Para realizar los estudios de OP, las bacterias se marcaron con el fluorocromo 5,6-carboxifluoresceína succinimidil éster (FAM-SE) (Molecular Probes) (Romero-Steiner *et al.*, 1997). En primer lugar, las cepas se incubaron en medio THY a 37°C hasta una  $DO_{580}$  de 0.6–0.7. A continuación, las bacterias se lavaron con tampón de bicarbonato sódico (0.1 M, pH 8.0), se añadieron 50  $\mu$ l de FAM-SE (10 mg  $ml^{-1}$  en dimetilsulfóxido) en 1 ml de tampón de bicarbonato sódico y se incubaron durante 1 h a 37°C con una atmosfera de  $CO_2$  al 5%. Posteriormente, se lavaron tres veces con HBSS comercial con  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . Los viales se conservaron a  $-80^{\circ}C$  en medio THY al que se le añadió 10% de glicerol para su posterior utilización.

### 6.2. OP mediada por neutrófilos polimorfonucleares

La fagocitosis mediada por células diferenciadas a neutrófilos se analizó mediante un ensayo de citometría de flujo empleando las cepas de neumococo marcadas con FAM-SE y la línea celular HL-60 (CCL-240; ATCC) diferenciada a neutrófilos polimorfonucleares en presencia de dimetilformamida (DMF) (Martínez *et al.*, 1999). El estado de diferenciación se confirmó, antes de los ensayos, usando un anticuerpo monoclonal anti-CD11b (cedido por el Prof. Carmelo Bernabéu, CIB-CSIC), que es un marcador de diferenciación granulocítico (Fleck *et al.*, 2005). Las células se lavaron dos veces con HBSS (sin  $Ca^{2+}$  ni  $Mg^{2+}$ ) suplementado con 0.2% de BSA y un lavado adicional con HBSS conteniendo  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  y 0.2% de BSA. Se realizó el recuento de las células viables en un hematocitómetro y, mediante tinción con azul tripán, se visualizó la proporción de células viables. Se realizó el experimento sólo cuando la viabilidad celular era superior al 95%. Las células se mantuvieron en frío hasta su utilización.

Los experimentos de OP se realizaron empleando placas multipocillo (Nunc) de fondo redondo. En primer lugar, se incubaron 10  $\mu$ l de una suspensión bacteriana ( $10^6$  UFC  $ml^{-1}$ ) marcada con FAM-SE con 10  $\mu$ l de suero humano diluido 1/20 o bien con HBSS con  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  durante 20 min a 37°C en agitación ( $150 \times g$ ). A continuación, se añadieron  $10^5$  células HL-60 diferenciadas o no, en función del experimento. La mezcla se incubó durante 30 min a 37°C en

agitación y oscuridad. Por último, se añadieron 50 µl de PFA al 3% para fijar las células e inactivar las bacterias y se completó el volumen con 100 µl de HBSS con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para su posterior análisis en el citómetro de flujo. Las muestras se transfirieron a tubos de citómetro y se guardaron en oscuridad hasta su análisis. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces y como controles negativos se emplearon bacterias incubadas en HBSS.

Los ensayos se repitieron, al menos, tres veces y los resultados se expresaron como IF o IFR. Se analizó la proporción de células HL-60 diferenciadas que fueron positivas y, por tanto, que habían fagocitado neumococo fluorescente y la intensidad de fluorescencia, que permite determinar cuántas moléculas se unen por bacteria. Se siguió el mismo criterio para el IF o IFR descrito en el apartado 5.1, según se tratase de bacteria genéticamente relacionada (o no) o en función de si era bacteria expuesta a algún tratamiento.

En el estudio basado en evaluar el impacto del HT sobre la OP, las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos fueron incubadas durante toda la noche anterior al experimento en presencia de EHT diluido al 1 y 5% en el medio de cultivo RPMI-1640 sin rojo fenol, pero suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor, Gln y con los antibióticos PEN-estreptomicina.

En los casos en los que se estudió la fagocitosis no mediada por el complemento, no se realizó el primer paso de incubación con suero descrito anteriormente. En este caso, se incubaron directamente 10 µl de una suspensión bacteriana ( $10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) marcada con FAM-SE con  $10^5$  células HL-60 diferenciadas a neutrófilos. El resto del procedimiento fue igual al descrito anteriormente.

### **7. ADHESIÓN E INVASIÓN DE *S. PNEUMONIAE* AL EPITELIO PULMONAR**

Para estudiar la interacción de los diferentes aislados de neumococo con el epitelio respiratorio se realizaron estudios de adhesión utilizando la línea celular de epitelio pulmonar A549 (CCL185; ATCC). Las monocapas de células A549 se crecieron en frascos de cultivos (Falcon) a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  hasta alcanzar una confluencia del 90–95%, utilizando medio RPMI-1640 con rojo fenol suplementado con 10% de SBF inactivado por calor, 1% de Gln, así como con los antibióticos PEN-estreptomicina. A continuación, las células se crecieron durante 24 h en placas de 24 pocillos (Falcon) con una densidad de  $2.5 \times 10^5$  células por pocillo.

El día del experimento, las células se lavaron previamente durante tres veces con PBS y se mantuvieron en 1 ml de RPMI-1640 sin ningún suplemento. La infección con los diferentes aislados bacterianos se realizó en una proporción de 25 bacterias por célula, centrifugándose la placa durante 3 min a  $150 \times g$  para favorecer el contacto bacteria-célula.

Para los ensayos de adhesión, las células se incubaron a 37°C durante 1 h en presencia de 5% de  $\text{CO}_2$ . A continuación, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y las células se lisaron con 300 µl de PBS-saponina 0.025% durante 10 min a 37°C. Se realizaron diluciones seriadas de los lisados celulares, que fueron sembradas en agar sangre. Para calcular la proporción de bacterias adheridas a las células infectadas se llevaron a cabo los correspondientes recuentos de viables. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces y los resultados de adhesión se expresaron como la proporción de bacterias recuperadas de las células A549 en relación al recuento bacteriano utilizado en la infección.

En el caso de los ensayos de invasión, las células, previamente infectadas con las diferentes cepas durante 1 h, se lavaron del mismo modo, 3 veces con PBS, y se incubaron durante 1 h adicional en medio de cultivo al que se le había añadido  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$  de gentamicina con el fin de matar las bacterias extracelulares. La proporción de bacteria internalizada se obtuvo, igualmente, lavando las células tres veces con PBS y procediendo a la lisis de las mismas, como se ha explicado anteriormente. Los experimentos se repitieron un mínimo de tres veces y los resultados de adhesión se expresaron como la proporción de bacterias recuperadas de las células A549 en relación al recuento bacteriano utilizado en la infección.

Por otro lado, cuando se llevó a cabo el estudio del impacto del HT en la interacción de neumococo con el epitelio pulmonar tanto a nivel de adhesión como de invasión, las células A549 se incubaron 24 h antes de la infección con EHT diluido al 5% en el medio de cultivo celular.

Para determinar el efecto de los tratamientos con corticoides en los pacientes con EPOC, se determinó el impacto de éstos en la adhesión e invasión de células A549 por los diferentes aislados clínicos de neumococo basándonos, para ello, en la metodología descrita anteriormente por otros grupos (Barbier *et al.*, 2008; Stolberg *et al.*, 2015). Las células fueron incubadas con dexametasona o fluticasona durante 2 o 4 h, respectivamente, a  $37^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se realizaron los ensayos para determinar el efecto sobre la adhesión e invasión de la misma manera que se ha explicado previamente para los ensayos sin tratamiento.

## 8. RECEPTORES CELULARES

### 8.1. Expresión de receptores de células epiteliales pulmonares

Para estudiar el efecto del HT sobre la expresión de determinados receptores presentes en las células epiteliales pulmonares se empleó la línea celular A549 (CCL185; ATCC). Los receptores que se analizaron fueron TLR4 y PAFr. La monocapa de células se creció según metodología previamente descrita. La exposición de las células a 1 y 5% de EHT diluido en el medio de cultivo celular se llevó a cabo durante 24 h previas al ensayo. Para ello, las células se crecieron en placas de 12 pocillos (Falcon) con una densidad de  $5 \times 10^5$  células por pocillo añadiendo el EHT a los pocillos correspondientes. Las células se lavaron con RPMI-1640, se centrifugaron a  $5000 \times g$  y se resuspendieron en un volumen de  $100 \mu\text{l}$  del mismo medio. A continuación, se incubaron durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con el anticuerpo primario correspondiente diluido 1/50 en RPMI-1640 (Tabla 7). Con el fin de eliminar el exceso de anticuerpo no unido, las células se lavaron con RPMI y centrifugaron a  $5000 \times g$ . Posteriormente, se incubaron durante 30 min en hielo y oscuridad con los anticuerpos secundarios diluidos 1/100 veces en RPMI (Tabla 7). Tras lavar, de nuevo, para eliminar el anticuerpo no unido, se añadieron  $50 \mu\text{l}$  de PFA al 3% para fijar las células. El volumen de todas las muestras se completó hasta  $200 \mu\text{l}$  con HBSS sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  para su posterior análisis mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS Calibur (BD Bioscience).

### 8.2. Expresión de receptores de células fagocíticas: PSGL-1, $\text{Fc}\gamma$

La expresión de los receptores PSGL-1 y  $\text{Fc}\gamma$  se analizó en células HL-60 diferenciadas o no en presencia de DMF. Además, se determinó el impacto del HT sobre la expresión de estos

receptores en esta línea celular. Las células se crecieron según se ha descrito en apartados anteriores y se expusieron a diferentes concentraciones de EHT (1 y 5%) durante 24 h antes del ensayo. Para detectar la expresión de los distintos receptores se incubaron  $2 \times 10^5$  células con 100  $\mu$ l de los correspondientes anticuerpos primarios diluidos 1/100 o 1/400 para la detección de Fc $\gamma$ R o PSGL-1, respectivamente (Tabla 7). Los tiempos de incubación fueron de 30 min para la detección de Fc $\gamma$ R y de 1 h para PSGL-1, ambos a temperatura ambiente. Los lavados posteriores y fijación de las bacterias se hicieron según la metodología previamente explicada en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. En el caso que el anticuerpo primario no estaba conjugado con ningún fluorocromo, se añadieron 100  $\mu$ l de anticuerpo secundario diluido 1/100 y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. El análisis se realizó mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS Calibur (BD Bioscience).

## 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 (O'Toole y Kolter, 1998). Brevemente, los cultivos de *S. pneumoniae* de los diferentes complejos clonales del serotipo 11A se incubaron en medio C+Y a 37°C hasta una DO<sub>550</sub> de 0.5–0.6. Posteriormente, las células se sedimentaron por centrifugación y se diluyeron 100 veces en medio CpH8. A continuación, las placas se inocularon con 200  $\mu$ l por pocillo ( $4.5 \times 10^6$  UFC/pocillo) por triplicado y se incubaron durante 6 h a 34°C. El crecimiento bacteriano se determinó midiendo a una DO<sub>595</sub> utilizando un lector de placas (*Microplate Absorbance Reader 2020*; Anthos Labtec Instruments GmbH). Posteriormente, se procesó el biofilm tiñendo cada pocillo con 50  $\mu$ l de una solución de cristal violeta al 1% y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Después, se lavó cada pocillo 3 veces con 200  $\mu$ l de agua destilada y se dejó secar al aire. La formación de biofilm teñido con cristal violeta se cuantificó solubilizando éste con 200  $\mu$ l de etanol al 96% y midiendo la DO<sub>595</sub>. Como control para cuantificar el biofilm formado por los diferentes aislados se empleó la cepa R6 de *S. pneumoniae*.

## 10. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

La microscopía de barrido láser confocal (CLSM) fue utilizada en esta Tesis para observar la arquitectura de los biofilmes, resistencia a la fagocitosis de los diferentes STs del serotipo 11A, la fagocitosis de los aislados procedentes de EPOC, ENI y los diferentes aislados crecidos en presencia de EHT, así como para visualizar la fagocitosis mediada por el receptor de neutrófilos PSGL-1. Asimismo, se empleó para determinar la adhesión e invasión diferencial de estos aislados de *S. pneumoniae* a las células A549 y para determinar la existencia de colocalización en dichos procesos con el PAFr.

### 10.1. Aplicación de la microscopía confocal en la detección de los biofilmes

Para la visualización de la arquitectura de los biofilmes mediante CLSM, se inocularon 2 ml de los cultivos bacterianos en placas con fondo de vidrio (WillCo-dish; WillCo Wells B. V., Holanda) durante 6 h a 34°C según las condiciones previamente descritas para la cepa R6 de *S. pneumoniae* (Moscoso *et al.*, 2006). A continuación, el medio de cultivo se retiró para lavar el biofilm con tampón SM (NaCl, 100 mM; MgSO<sub>4</sub>, 8 mM; Tris-HCl, 50 mM, pH 7.5) y se tiñó empleando el kit *BacLight*, que permite diferenciar las células vivas (fluorescencia verde) de las muertas (fluorescencia roja), ya descrito en la literatura (Moscoso *et al.*, 2006). Los biofilmes se observaron utilizando el microscopio Leica TCS-SP2-AOBS-UV CLSM y el objetivo de 63 ×. 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 μm) y x–z (imágenes a intervalos de 3 y 5 μm).

### 10.2. CLSM para el estudio de la interacción de *S. pneumoniae* con células del hospedador

#### 10.2.1. Fagocitosis mediada por células HL-60 diferenciada a neutrófilos

Para observar la resistencia a la fagocitosis de los diferentes STs del serotipo 11A, así como entre los diferentes aislados clínicos analizados durante esta Tesis Doctoral (procedentes de EPOC, ENI, cepas tipo EPOC y súper EPOC), las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos se infectaron con bacteria marcada con FAM-SE utilizando la metodología descrita en el apartado 6.2. de Materiales y Métodos. En el caso de analizar la fagocitosis inducida por la activación del sistema del complemento, se incubaron las bacterias con suero humano diluido 1/10, durante 30 min a 37°C en agitación, para permitir la opsonización bacteriana por los componentes del suero. Sin embargo, cuando se estudió la fagocitosis mediada por el receptor PSGL-1, este primer paso de incubación de la bacteria con suero se omitió con el fin de evitar la fagocitosis mediada por receptores del complemento. Como las células HL-60 crecen en suspensión, no adhiriéndose a las placas de cultivo celular, tras el proceso de fagocitosis, explicado anteriormente, las células se centrifugaron en un *cytospin* 3 (Thermo Electron, Pittsburgh, PA) durante 2 min a 1100 × *g* para conseguir que las células se pudieran adherir a cristales de 13 mm de diámetro (VWR international) (Huang *et al.*, 2010; Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). Las células se fijaron con 3% de PFA durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 1 ml de una solución 1 M de NH<sub>4</sub>Cl en PBS. Para la tinción del DNA celular, así como del citoesqueleto de actina, los cristales con las células infectadas se lavaron dos veces con una solución de PBS–saponina al 0.1% seguido de un lavado con PBS. El DNA se marcó con Hoechst (Invitrogen™) diluido 1/2500. El citoesqueleto celular se marcó utilizando un conjugado de rodamina-faloidina (Invitrogen™), diluido 1/200, que se une a la actina F. Transcurridos 30 min de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, las células se lavaron dos veces en 0.1 % de PBS-saponina, una vez con PBS pH 7.0 y una vez en agua, y los cristales se montaron en un porta de microscopía con *Aqua Poly/Mount* (Polysciences®). Las células fagocitarias se observaron utilizando un microscopio Leica© spectral SP5 y el objetivo Plan APO 63 1.4. Las imágenes se analizaron mediante el programa de *LEICA APPLICATION SUITE ADVANCED FLUORESCENCE* (LAS AF). Se obtuvieron las proyecciones de los planos xyz.

### 10.2.2. Adhesión e invasión de células epiteliales pulmonares

En los ensayos de adhesión e invasión de los diferentes aislados de *S. pneumoniae* a las células A549, así como para visualizar la posible colocalización de los diferentes aislados con el PAFr, se siguió el procedimiento descrito en el apartado 7 de Materiales y Métodos con pequeñas variaciones. Las células se crecieron durante 24 h en placas multipocillo que contenían cristales de 13 mm de diámetro (VWR international) con el fin de que las células se pudieran adherir a los mismos. Las células, en vez de lisadas con saponina para su posterior cuantificación, fueron fijadas con 300 µl de PFA al 3%, lavadas con PBS y resuspendidas en 1 ml de una solución 1 M de NH<sub>4</sub>Cl en PBS para su procesamiento posterior. La tinción del DNA y el citoesqueleto se realizó siguiendo la metodología descrita anteriormente para células HL-60. Para la detección de PAFr, se tiñeron las células con el anticuerpo primario de conejo anti-PAFr humano (Santa Cruz) diluido 1/100 y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. A continuación, tras dos lavados de los cristales con 0.1 % de PBS-saponina y una vez con PBS a pH 7.0, se incubaron los cristales durante 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con TRITC diluido 1/200, con el fin de marcar el PAFr en rojo. Trascurrido este tiempo, se lavaron los cristales dos veces con una solución de PBS-saponina al 0.1%, una vez con PBS a pH 7.0 y una vez en agua destilada, para eliminar el exceso de anticuerpo no unido, y se montaron los cristales con *Aqua Poly/Mount* (Polysciences©). Las células se observaron utilizando el mismo microscopio y programa informático descrito en el apartado anterior.

## 11. MODELOS ANIMALES

Todos los experimentos con animales empleados en esta Tesis Doctoral cumplieron con la normativa vigente sobre manejo y cuidado de animales en materia de experimentación y bienestar animal según la legislación española (RD 53/2013 y RD 1201/2005), así como con las regulaciones correspondientes de la Unión Europea (218/63/UE). Los experimentos en animales realizados en este trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (CBA PA 52\_2011-v2), por el Órgano encargado del bienestar animal del ISCIII (M-03-2015), así como por la Consejería de Medio Ambiente, Administración local y ordenación del territorio de la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX 218/15).

Los animales BALB/c y C57BL/6 utilizados fueron criados en el animalario del ISCIII. Los ratones CD-1, fueron suministrados por Harlan, y los ratones deficientes en PSGL-1, fueron cedidos por el grupo de investigación liderado por el Prof. Francisco Sánchez-Madrid y la Dra. Ana Urzainqui (Hospital de la Princesa, Madrid). Hay que destacar que, para determinar la virulencia de los diferentes aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC y ENI pertenecientes a los serotipos 11A y 16F, se utilizaron ratones BALB/c machos o hembras indistintamente de unas 8–16 semanas de edad. Los experimentos de neumonía neumocócica se realizaron utilizando ratones hembras BALB/c, CD-1 y C57BL/6 de unas 8–16 semanas de edad. El motivo de utilizar ratones de distinta especie para los diferentes modelos de infección reside en que la susceptibilidad a la infección neumocócica varía en función de la especie de

ratón y el tipo de infección, ya sea neumonía, sepsis o colonización nasofaríngea (Gingles *et al.*, 2001).

### **11.1. Determinación de la virulencia de los aislados del serotipo 11A y 16F**

En primer lugar, se estudió la capacidad de los aislados invasivos silvestres de los serotipos 11A y 16F objeto de estudio en esta Tesis Doctoral para inducir neumonía bacteriémica en los ratones. Para ello, se inocularon grupos de 5 animales, machos o hembras indistintamente, de la estirpe BALB/c, bajo anestesia con isoflurano, por vía intranasal (in) con 50  $\mu\text{l}$  de una suspensión bacteriana conteniendo una dosis infectiva muy alta, en torno a  $10^8$ – $10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , de los diferentes aislados de *S. pneumoniae* debido a la baja capacidad infectiva de estos serotipos en modelos murinos. La suspensión bacteriana se realizó, además, en medio de cultivo THY, ya que favorece la virulencia en las cepas de neumococo (Aaberge *et al.*, 1995). Los animales se sacrificaron con una dosis letal de pentobarbital a las 24 h o 72 h tras la infección y se realizaron recuentos bacterianos a partir de sangre obtenida de la arteria femoral, de los pulmones y del BALF. Además, se determinaron los recuentos bacterianos a lo largo de los días a partir de una muestra de 6  $\mu\text{l}$  de sangre obtenida de la vena de la cola de los animales infectados. Los recuentos bacterianos se determinaron mediante diluciones seriadas y siembra en placas de agar sangre.

### **11.2. Obtención de la cepa virulenta del serotipo 16F de *S. pneumoniae* en modelos murinos de neumonía bacteriémica**

Con el objetivo de incrementar la virulencia de las cepas y conseguir neumonía bacteriémica en un modelo murino, se inoculó a un grupo de 2 animales hembras de la estirpe CD1 (8–16 semanas), por vía intraperitoneal (ip), con 200  $\mu\text{l}$  de una suspensión bacteriana conteniendo una dosis infectiva muy alta de  $10^9$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  del aislado 1722<sup>16F</sup>. Los animales se sacrificaron, con una dosis letal de pentobarbital, a las 24 h tras la infección, y se les extrajo sangre mediante punción cardíaca que fue sembrada en placas de agar sangre e incubada a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h. Las bacterias crecidas se recogieron con un asa de siembra y se incubaron en medio de cultivo THY a 37°C hasta alcanzar una DO<sub>550</sub> de 0.6. Las nuevas cepas, recuperadas de sangre de ratón, se conservaron congeladas a –80°C en el medio de cultivo empleado al que se le añadió glicerol al 10% (v/v) y este vial fue nombrado como 1722<sup>16FR1</sup>. Estos nuevos aislados fueron empleados para inocular a un nuevo grupo de 2 animales hembras de la estirpe CD1 por vía in con 50  $\mu\text{l}$  de suspensión bacteriana conteniendo  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  del aislado 1722<sup>16FR1</sup>. Para ello, se centrifugó 1 ml de bacterias 5 min a 16000  $\times g$  y el sedimento se resuspendió en 200  $\mu\text{l}$  de THY. Una vez se recuperó, de nuevo, bacteria en sangre se repitió el procedimiento descrito anteriormente hasta alcanzar, en el cuarto pase a través de la sangre del ratón, el aislado 1722<sup>16FR4</sup> capaz de producir neumonía bacteriémica de manera reproducible.

Para determinar la dosis letal mínima (DL<sub>100</sub>) de la cepa 1722<sup>16FR4</sup>, es decir, la dosis capaz de producir el 100% de mortalidad en un período de 7 días, se inocularon grupos de 5 ratones CD-1 y C57BL/6 de 8–16 semanas por vía in con diferentes diluciones bacterianas en medio THY.

### 11.3. Modelo de neumonía neumocócica

Para el modelo de neumonía, las cepas 1722<sup>16F</sup>R4 (ENI de ratón) y 1722<sup>16F</sup>R4HT (tipo EPOC de ratón) se inocularon por vía in, bajo anestesia, con isofluorano con 50 µl de suspensión bacteriana conteniendo  $1 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> a un grupo de 20 animales CD-1 hembras. A las 24–48 h post-infección se sacrificaron 5 animales de cada grupo de infección con una dosis letal de pentobarbital, y se recuperaron las bacterias de la sangre de la arteria femoral de los ratones. Además, se obtuvieron las bacterias de los pulmones y del BALF con la ayuda de un catéter con el que se realizaron lavados con 1 ml de PBS. Los recuentos bacterianos se determinaron mediante diluciones seriadas y siembra en placas de agar sangre. Los 10 animales restantes fueron observados diariamente anotando la muerte y supervivencia de los mismos, así como su estado de salud durante un período de 7 días. Además, se determinaron los recuentos bacterianos a lo largo de los días a partir de una muestra de 6 µl de sangre obtenida de la vena de la cola de los animales infectados. El séptimo día los ratones supervivientes fueron sacrificados con pentobarbital y se recuperaron las bacterias de la sangre de la arteria femoral, pulmones y BALF. Alternativamente, cuando se quiso estudiar el impacto del HT sobre la neumonía neumocócica, los animales fueron expuestos a EHT durante 1 a 4 semanas. Para ello, los animales fueron anestesiados previamente con isofluorano e inoculados vía in con 30 µl de EHT puro una vez al día. En estos ensayos se incluyó de manera paralela un grupo de 5 animales control a los que no se les infectó, pero sí se les sometió a la exposición a EHT.

### 11.4. Cuantificación de niveles de PSGL-1, ADAM8 y células presentadoras de antígeno en sangre periférica y pulmón

#### 11.4.1. Determinación en sangre periférica

Para determinar los niveles de PSGL-1, ADAM8 y células presentadoras de antígeno en los diferentes grupos de animales expuestos o no a EHT durante 1 o 4 semanas, se extrajo sangre de la vena mandibular a la que se le añadió heparina (1000 U ml<sup>-1</sup>) para evitar su coagulación. A continuación, se incubaron 50 µl durante 5 min a 4°C con 10 µl de *FcBlock* (BD Pharmingen) diluido 1/200 para bloquear los receptores Fcγ de las células presentadoras de antígeno y evitar la unión inespecífica. Se prepararon tres mezclas de anticuerpos dirigidos frente a las moléculas de membrana (Tabla 7), de las cuales se añadieron 10 µl y se incubaron durante 10 min a 4°C en oscuridad. Trascurrido este tiempo las muestras se lavaron con 2 ml de PBS, se centrifugaron 4 min a 5000 × g y se incubaron con 2 ml de *Fix/Perm Lysing Solution* (BD Pharmingen) con el fin de fijar las células y lisar los eritrocitos. Por último, las muestras se centrifugaron y lavaron, de nuevo, con PBS para su posterior análisis mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS canto II (BD Bioscience).

#### 11.4.2. Determinación en pulmón

La cuantificación de los niveles de PSGL-1, ADAM8 y células presentadoras de antígeno se determinó en los pulmones de los ratones expuestos o no a EHT. Para ello, los pulmones extraídos de los ratones se resuspendieron en RPMI-1640 sin suplementos y se mantuvieron a

4°C hasta su utilización. Previo al marcaje los pulmones fueron disgregados y digeridos con 1 ml de una solución de digestión (colagenasa A 10 mg ml<sup>-1</sup>, dispasa 100 mg ml<sup>-1</sup>, DNAsa 0.1% y RPMI-1640) durante 1 h a 37°C en agitación. A continuación, se filtraron con 1 ml de PBS suplementado con BSA (0.5%) y EDTA (5 mM) y centrifugaron durante 5 min a 5000 × g. Posteriormente, se resuspendieron en 50 µl de PBS suplementado con BSA (0.5%) y EDTA (5 mM) y se filtraron, de nuevo, utilizando filtros de 30 µm (Beckton Dickinson). El filtrado de pulmón se centrifugó y el volumen final se ajustó a 700 µl de muestra. Para el marcaje de las distintas moléculas se siguió la misma metodología empleada para la sangre periférica. El análisis se realizó mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACS canto II (BD Bioscience).

## 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos que se muestran a lo largo de esta Tesis Doctoral son representativos de los resultados obtenidos de la repetición de experimentos independientes con un mínimo de 2 o 4 cepas de cada serotipo. Además, cada dato muestra la media y la desviación estándar (DS) de 3–5 réplicas. Para el análisis estadístico se empleó el test *t* de Student de dos colas mientras que para las comparaciones múltiples se usó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de un test de Dunnett. Los experimentos de supervivencia, en los que se determinó el impacto del HT sobre la bacteria, así como en el hospedador, se utilizó el test *log-rank* ordinal (Mantel–cox) para comparar el valor significativo de los animales supervivientes en los diferentes grupos experimentales. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GRAPHPAD INSTAT versión 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 13. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

### 13.1. Control de calidad de los datos

La especie bacteriana a la que pertenece el DNA secuenciado fue confirmada, al igual que se comprobaron las posibles contaminaciones de DNA, mediante el uso de la herramienta informática *KRAKEN* (Wood y Salzberg, 2014) que asigna las lecturas secuenciadas a unidades taxonómicas e informa del porcentaje de lecturas asociadas a cada especie detectada. Además, las muestras fueron serotipificadas mediante el uso de la herramienta bioinformática “*PNEUMOCAL\_SEROTYPING*” para confirmar el fenotipo asignado desde <http://datadryad.org/resource/doi:10.5061/dryad.t55gq>. La determinación del secuencitipo de los ensamblajes se llevó a cabo, como se describe en <http://spneumoniae.mlst.net/> (Enright y Spratt, 1998), mediante la técnica de MLST y empleando la secuencia de comandos “*SEQUENCE\_TYPING*” de [https://github.com/sanger-pathogens/mlst\\_check](https://github.com/sanger-pathogens/mlst_check). Estos datos permitieron identificar cualquier emparejamiento erróneo entre los metadatos y los datos de las secuencias, las cuales indicarían la existencia de mezcla de aislados en las mismas.

### 13.2. Programas informáticos

Los ensamblajes de los genomas se obtuvieron utilizando una herramienta bioinformática diseñada por *The Wellcome Trust Sanger Institute* que utiliza el programa *VELVET* como ensamblador (Zerbino y Birney, 2008), el ordenado de los *contigs* y relleno de huecos se

realiza con SSPACE (Boetzer *et al.*, 2011) y GAPFILLER (Boetzer y Pirovano, 2012). A continuación, para utilizar el genoma de las cepas silvestres de pacientes con ENI, como referencia para la localización de los genes, los *contigs* ensamblados fueron reordenados mediante ABACAS (Assefa *et al.*, 2009) empleando como referencia el genoma completo y anotado de la cepa de *S. pneumoniae* ATCC 700669.

Los programas BWA y BCFTOOLS v1.2 se emplearon para llevar a cabo el proceso de mapeo de las lecturas frente a una referencia, así como también para buscar polimorfismos de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e identificar INDELS (una o más bases insertadas o delecionadas) (Li, 2011; Uricaru *et al.*, 2015). Además, para evitar el sesgo de la referencia e identificar SNPs e INDELS frente a ésta de una manera independiente, se usó también la herramienta CORTEX (Li, 2011; Uricaru *et al.*, 2015). Una vez ordenados los *contigs*, los “borradores” de los genomas empleados como referencia, se anotaron usando el programa PROKKA (Seemann, 2014). Para el análisis del pangenoma se utilizó ROARY (Page *et al.*, 2015). La herramienta de visualización empleada para localizar los diferentes puntos a lo largo del genoma en un gráfico con valores *P* exactos para el test de Fisher fue PHANDANGO (<http://jameshadfield.github.io/phandango/>). La PCR *in silico* se realizó a partir de los *contigs* ensamblados utilizando los oligonucleótidos indicados en la Tabla 7 y mediante la herramienta bioinformática de la red interna de *The Wellcome Trust Sanger Institute* (“PRIMERS\_TO\_TAB” [S. R. Harris]). Los árboles filogenéticos se produjeron a partir del alineamiento de los SNPs obtenidos en el mapeo mediante la herramienta RAXML (Stamatakis, 2015). Los SNPs se reconstruyeron para la filogenia de los clones de los aislados de pacientes con EPOC mediante la herramienta bioinformática de la red interna de *The Wellcome Trust Sanger Institute* “SNP\_RECONSTRUCTION” y se visualizaron mediante ITOL. Las filogenias se encuentran anotadas en MICROREACT.ORG.

### 13.3. Otros

También se utilizaron otros programas accesibles a través de Internet como BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul *et al.*, 1990), CLUSTAL W2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) (Larkin *et al.*, 2007), CLUSTAL OMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustal/>) (Sievers *et al.*, 2011). Cualquier cambio de nucleótido fue visualizado mediante la herramienta ARTEMIS y ARTEMIS COMPARISON TOOLS (ACT) (Carver *et al.*, 2005).

## **IV. RESULTADOS**



## 1. EMERGENCIA DE VARIANTES DE *S. PNEUMONIAE* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS QUE EXPRESAN EL SEROTIPO 11A

El proceso de intercambio de genes capsulares entre aislados de neumococo supone una preocupación importante a la hora de controlar la diseminación de la ENI. El incremento evidente de este intercambio capsular agrava la situación para ciertos genotipos de determinados serotipos, ya que permite a los clones preexistentes de *S. pneumoniae* que expresan serotipos vacunales, escapar de la inmunidad inducida por la vacunación mediante la adquisición de genes capsulares de otros serotipos no vacunales. En este primer objetivo de la Tesis Doctoral se analizaron 492 aislados clínicos del serotipo 11A de *S. pneumoniae* que causaron ENI en España entre los años 2000 y 2012, lo cual supone una amenaza importante para la salud pública puesto que este serotipo no está incluido en ninguna de las vacunas conjugadas comercializadas. Por esta razón, se caracterizó la composición clonal y los mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos de dichos aislados. Además, se investigó la capacidad de los mismos para evadir la inmunidad mediada por el sistema del complemento y la fagocitosis.

### 1.1. Evolución epidemiológica de los aislados clínicos del serotipo 11A de *S. pneumoniae*

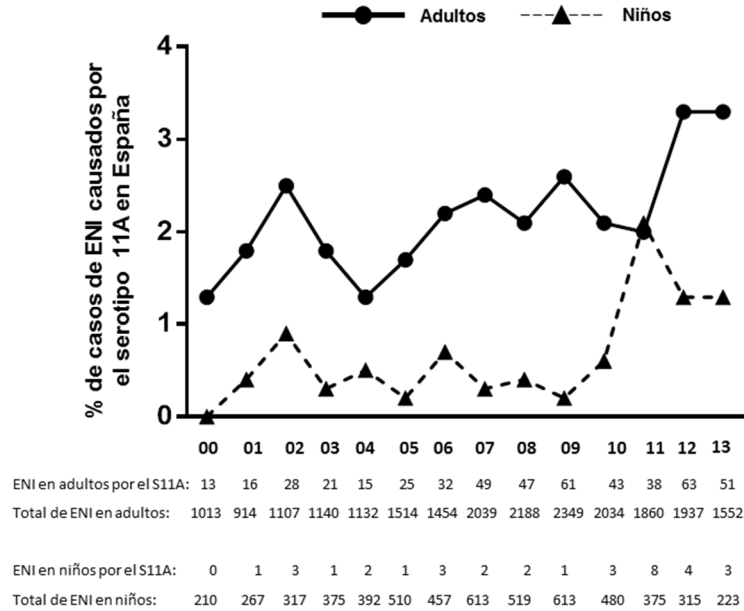
Se analizó la evolución epidemiológica de un total de 492 aislados clínicos de ENI (1.9%) y 737 aislados no invasivos (no-ENI) (2.8%) que expresaban el serotipo 11A, de los 26 124 aislados clínicos de *S. pneumoniae* recibidos en el Laboratorio de Referencia de Neumococo de España en el periodo 2000–2012. La Figura 9 muestra la tendencia de la frecuencia del serotipo 11A produciendo ENI y no-ENI en niños y adultos. De entre los aislados clínicos de ENI, 451 eran aislados procedentes de adultos (1.7% del total de adultos con ENI) y 31 fueron obtenidos de niños (0.1% del total de niños con ENI) (Fig. 9A). Se observa, por tanto, que durante el periodo de estudio, este serotipo se aisló más frecuentemente causando ENI entre la población adulta ( $P < 0.001$ ) y que el porcentaje de casos producidos aumentó de un 1.3% (13 aislados) al inicio del estudio, a un 3.3% en 2012 (67 aislados) ( $P < 0.01$ ) (Fig.9A). En los últimos tres años del estudio, coincidiendo con la introducción de PCV13 en España, el aumento observado en la proporción de casos de ENI causados por aislados de dicho serotipo fue especialmente significativo, pasando de un 2.1% (46 aislados) en el año 2010 a un 3.3% en 2012 (67 aislados) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 9A). En la población pediátrica, la tasa de enfermedad neumocócica causada por este serotipo se ha mantenido tradicionalmente más baja que en adultos, aunque en los últimos años también se ha observado un incremento de los casos de ENI (Fig. 9A). Estos datos son más pronunciados cuando se tienen en cuenta los casos de neumonía no bacteriémica en adultos y otitis media aguda en niños (Fig. 9B). De la misma manera, tras la introducción de PCV13 se observó un aumento importante de los casos de no-ENI causados por el serotipo 11A tanto en niños como en adultos (Fig. 9B).

Siguiendo los puntos de corte establecidos por el CLSI, todos los aislados clínicos del serotipo 11A recibidos hasta el año 2004 eran susceptibles a PEN ( $\text{CMI} \leq 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (PEN-S), CTX/CRO ( $\text{CMI} \leq 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y AMX ( $\text{CMI} \leq 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Sin embargo, en 2005 se detectaron los primeros aislados de este serotipo con altos niveles de resistencia a PEN ( $\text{CMI} \geq 2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) (PEN-R) y a AMX ( $\text{CMI} \geq 4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), los cuales se incrementaron especialmente en el año 2010 hasta alcanzar el 23.8% de los casos entre los aislados invasivos de neumococo del serotipo

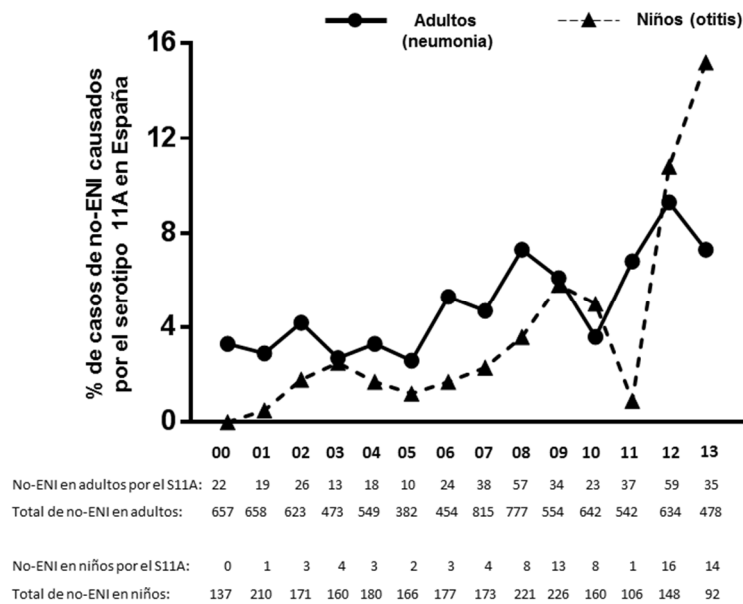
RESULTADOS

11A estudiados en el año 2012 (15 aislados PEN-R frente a 48 aislados PEN-S) ( $P < 0.001$ ) (Fig. 9C).

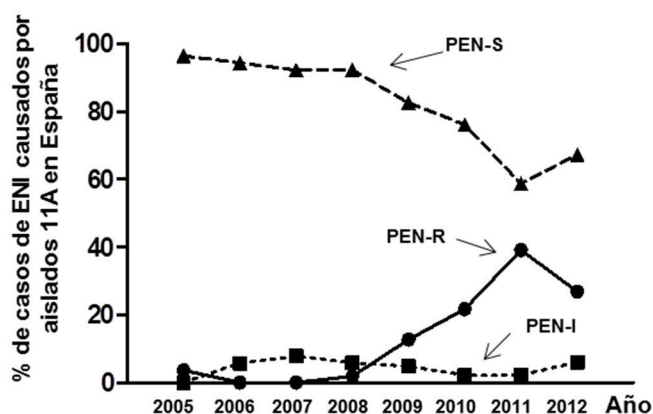
**A**



**B**



C

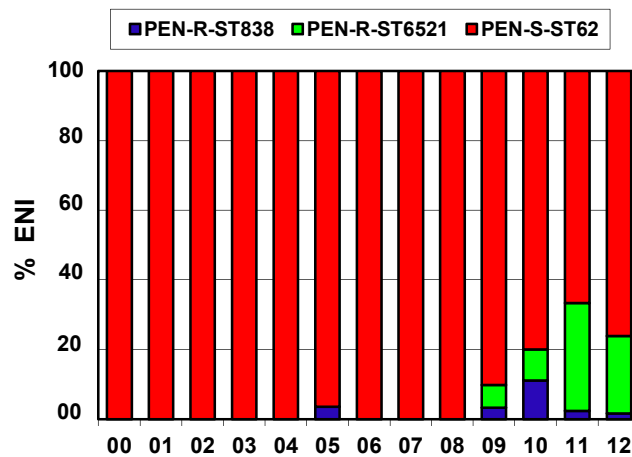


**Fig. 9 Representación del porcentaje de casos de enfermedad neumocócica producidos por el serotipo 11A en España.** (A) Evolución de los casos de ENI en adultos y niños. (B) Evolución de los casos de enfermedad neumocócica no invasiva (no-ENI) en adultos (neumonía no bacteriémica) y niños (otitis media aguda). (C) Proporción de aislados del serotipo 11 dependiendo de su susceptibilidad a PEN. Los aislados susceptibles a PEN (PEN-S) presentaron una CMI  $\leq 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Los aislados PEN-I tenían unos valores de susceptibilidad intermedios a PEN ( $0.12\text{--}1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Se consideraron aislados PEN-R cuando la CMI  $\geq 2 \mu\text{g ml}^{-1}$ . S11A, serotipo 11A.

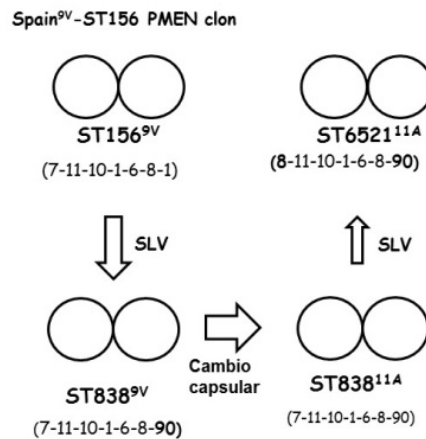
## 1.2. Caracterización molecular

La caracterización molecular de los diferentes aislados del serotipo 11A de neumococo mediante PFGE reveló que los 70 aislados PEN-S estaban relacionados con el secuencitipo 62, ST62<sup>11A</sup>. Se asumió que el ST62<sup>11A</sup> es el predominante entre los aislados del serotipo 11A PEN-S ( $n = 447$ ; 90.6%, Fig. 9C). La caracterización de los aislados PEN-R demostró la existencia de dos genotipos distintos, el ST6521<sup>11A</sup> ( $n = 35$ , 7.3%) y el ST838<sup>11A</sup> ( $n = 10$ , 2.1%).

El ST838<sup>11A</sup> fue el primero que se detectó (en 2005), pero su mayor incidencia se registró en los años 2009 y 2010 (Fig. 10). La aparición del ST6521<sup>11A</sup> no fue hasta 2009, sin embargo, su incidencia fue aumentando gradualmente hasta 2012, alcanzando en 2011 su mayor valor, el 31% de los casos de ENI (Fig. 10), y es actualmente el más prevalente en la población dentro de los aislados clínicos PEN-R del serotipo 11A. Los datos derivados de este estudio han permitido conocer el posible origen de estos secuencitipos, los cuales se ha sugerido que son variantes del clon Spain<sup>9V</sup>-ST156 (Fig. 11). El ST838<sup>11A</sup> surgió como resultado, primero, de la variación de un solo nucleótido o SLV en el gen *ddl*, que favoreció la aparición de aislados ST838<sup>9V</sup> con elevados niveles de resistencia a PEN y AMX, y después, por la presión inmunológica provocada por la implantación de las vacunas conjugadas, que permitió al ST838<sup>9V</sup> cambiar su cápsula por la del serotipo 11A (Fig. 11 y Tabla 8). Finalmente, otro cambio de tipo SLV en el ST838<sup>11A</sup>, pero en este caso en el gen *aroE*, favoreció la aparición del ST6521<sup>11A</sup>, manteniendo los altos niveles de resistencia antibiótica a ambos antimicrobianos, con valores de CMI en torno a  $4\text{--}16 \mu\text{g ml}^{-1}$  para AMX, que son muy elevados si se comparan con el valor de la CMI presentado por los aislados de ST62<sup>11A</sup> (Tabla 8).



**Fig. 10. Emergencia de aislados PEN-R del serotipo 11A causando ENI.** Distribución de los genotipos durante el periodo de estudio (2000–2012). Los aislados del ST62<sup>11A</sup>, PEN-S (CMI ≤ 0.06 µg ml<sup>-1</sup>), se representan en rojo y los aislados PEN-R (CMI ≥ 2 µg ml<sup>-1</sup>), ST6521<sup>11A</sup> y ST838<sup>11A</sup>, en verde y azul, respectivamente. Todos los aislados PEN-R fueron genotipificados por MLST mientras que sólo 70 aislados del serotipo 11A PEN-S fueron sometidos a este análisis.



**Fig. 11. Representación esquemática del origen de los clones resistentes ST6521<sup>11A</sup> y ST838<sup>11A</sup>.** La evolución del clon Spain<sup>9V</sup>-ST156 PMEN (*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*) dio lugar al origen de los ST6521 y ST838 expresando el serotipo 11A. En negrita se representan los SLVs en el MLST de los aislados que han originado las nuevas variantes con altos niveles de resistencia a PEN y AMOX. Los valores entre paréntesis corresponden a los alelos de los genes del MLST (*aroE* – *gdh* – *gki* – *spi* – *recP* – *xpt* – *ddl*).

### 1.3. Determinación de las PBPs

En *S. pneumoniae* la resistencia a antibióticos β-lactámicos está ligada a modificaciones en las PBPs, principalmente en PBP1A, PBP2B y PBP2X, las cuales reducen la afinidad a estos antibióticos. La localización de los genes *pbp1a* y *pbp2x*, flanqueando al gen capsular, lleva en ocasiones a nuevos CPS junto con nuevos genes *pbp*. Por ello, se utilizó la PCR-RFLP para investigar los perfiles de *pbp1a*, *pbp2b* y *pbp2x* en todos los aislados PEN-R (n = 45) y se compararon con los de los aislados PEN-S del ST62<sup>11A</sup> y con la cepa ATCC 700671 (Spain<sup>9V</sup>-

ST156). Todos los aislados clínicos de los ST838<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> mostraron idénticos perfiles de PCR-RFLP para *pbp1a*, *pbp2b* y *pbp2x*, lo que se asocia con los valores similares de CMI que muestran frente a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (PEN, 2-4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; CTX, 1-2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; AMX, 4-16  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) (Tabla 8). En comparación con la cepa ATCC 700671, los tres aislados PEN-R compartieron la misma secuencia de *pbp1a* pero diferían ligeramente en la secuencia de *pbp2x* y *pbp2b*. El análisis *in silico* de las secuencias de PBP2X confirmó que la diferencia radicaba únicamente en cinco aminoácidos, cuya posición no estaba asociada a un incremento en la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Asimismo, las diferencias encontradas en las secuencias de las PBP2B de los aislados clínicos estudiados, ST6521<sup>11A</sup> y ST838<sup>11A</sup>, frente a la cepa ATCC 700671, correspondían a 21 aminoácidos cuyas posiciones tampoco parecen estar asociadas al incremento en la resistencia a dichos antibióticos. Sin embargo, la comparación de los aislados PEN-R con los perfiles observados para los aislados ST62<sup>11A</sup> fueron completamente diferentes. Por lo tanto, el análisis de las secuencias de los genes *pbp* confirmaron que los tres genes expresados por los aislados ST838<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> eran idénticos entre sí y completamente diferentes a los observados en los aislados ST62<sup>11A</sup> (18.7% para *pbp1a*, 7.0% para *pbp2b* y 15% para *pbp2x*).

**Tabla 8.** Genotipos, CMI frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y caracterización de las PBPs de los aislados de *S. pneumoniae* que expresan el serotipo 11A.

Secuencitipo	Alelos MLST <sup>a</sup>							CMI ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) <sup>b</sup>			Alelos PBP <sup>c</sup>		
								PEN	CTX	AMOX	1A	2B	2X
ST62 <sup>d</sup>	2	5	29	12	16	3	14	$\leq 0.06$	$\leq 0.06$	$< 0.5$	A	A	A
ST156 PMEN <sup>e</sup>	7	11	10	1	6	8	1	1.5	0.75	$\leq 4$	B	B	B
ST838	7	11	10	1	6	8	90	2-4	1-2	4-16	B	C	B
ST6521	8	11	10	1	6	8	90	1-4	0.5-2	4-16	B	C	B

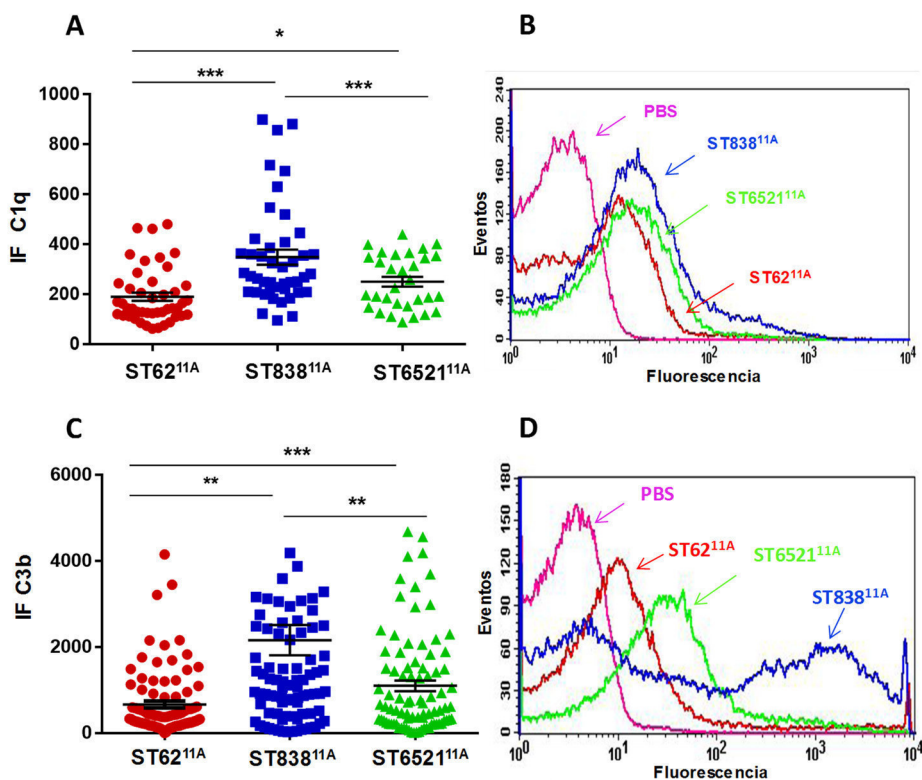
<sup>a</sup>Alelos: *aroE* – *gdh* – *gki* – *spi* – *recP* – *xpt* – *ddl*. <sup>b</sup>PEN, penicilina (CMI  $\leq 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ ); CTX–CRO, cefotaxima-ceftriaxona (CMI  $\leq 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ ); AMOX, amoxicilina (CMI  $\leq 0.06 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). <sup>c</sup>Las letras mayúsculas se usaron para definir los diferentes alelos de cada PBP. <sup>d</sup>Sólo se tipificaron 70 aislados PEN–S. <sup>e</sup>Spain<sup>9V</sup>-ST156 (ATCC 700671) PMEN se empleó como aislado representativo de este genotipo. En este estudio no se detectaron cepas de neumococo del ST156 expresando el serotipo 11A.

#### 1.4. Reconocimiento de los diferentes genotipos del serotipo 11A de *S. pneumoniae* por el sistema del complemento

El sistema del complemento es una de las primeras líneas de defensa frente a patógenos invasores, como es *S. pneumoniae*. La emergencia de ciertos genotipos o aislados de neumococo podría estar ligada a una mayor eficiencia de los mismos evadiendo el sistema inmune del hospedador, aumentando así la virulencia del microorganismo. Los resultados mostrados en el apartado 1.1 mostraban que los aislados PEN-S (ST62<sup>11A</sup>) eran más prevalentes en la población que los aislados PEN-R, aunque en los últimos años del estudio estas diferencias disminuyeron significativamente (Figs. 9C y 10). Además, se ha observado que entre los aislados PEN-R del serotipo 11A, el ST6521<sup>11A</sup> se ha expandido más en comparación al ST838<sup>11A</sup> (Fig. 10). Teniendo en cuenta estos resultados, se planteó como posible explicación por la que

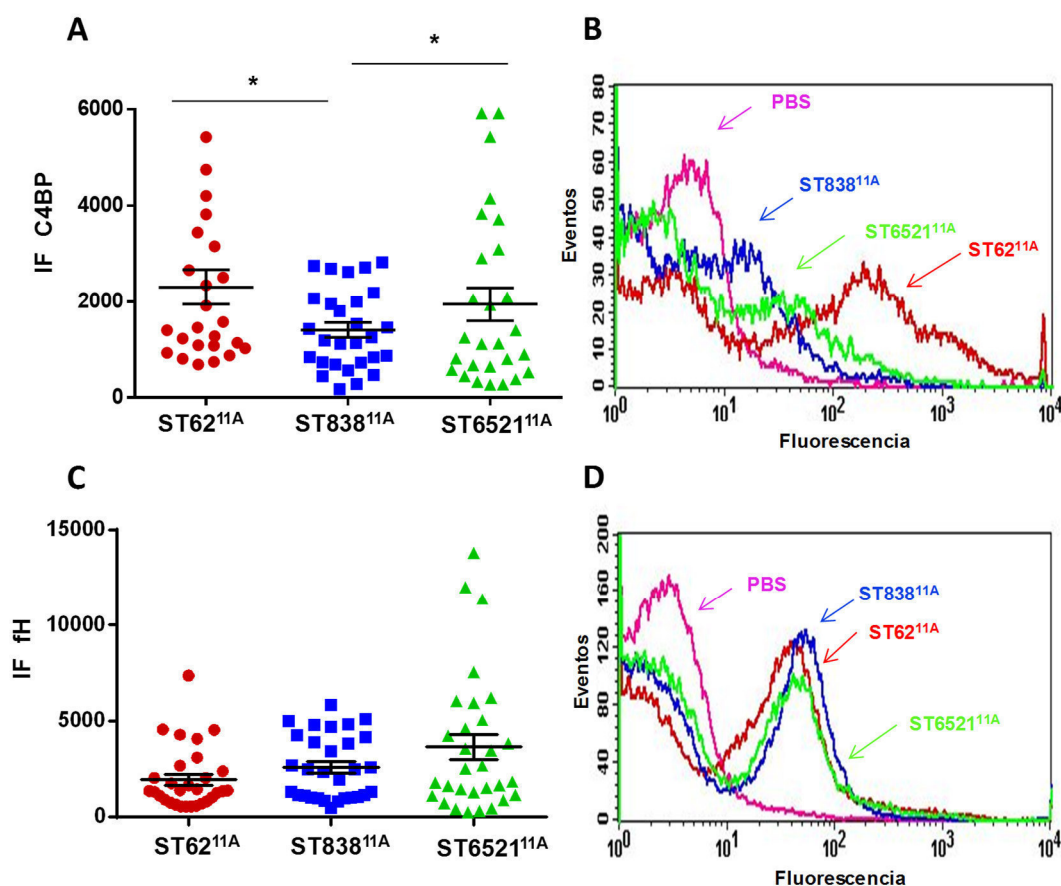
determinados genotipos, dentro del serotipo 11A, son más frecuentes en la población podría ser debido a que fueran reconocidos de modo diferente por los mecanismos de defensa del hospedador, como el sistema del complemento y la fagocitosis.

Para estudiar la capacidad de los diferentes secuencitipos de evadir el sistema del complemento se investigó, en primer lugar, la activación de la CP, que es esencial en el reconocimiento de neumococo (Brown *et al.*, 2002; Yuste *et al.*, 2008). Para este estudio se incluyeron 5 aislados clínicos de cada genotipo y se analizó la interacción de los tres secuencitipos con el primer componente de esta vía (C1q) y con el componente clave C3b. Los resultados mostraron que el reconocimiento de los aislados del ST62<sup>11A</sup> por C1q y C3b fue significativamente inferior en comparación a los secuencitipos PEN-R, lo que explicaría por qué este secuencitipo es más frecuente en la población que el ST838<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> (Fig. 12). Por otro lado, los aislados invasivos del ST6521<sup>11A</sup> mostraron un menor depósito de las moléculas C1q y C3b sobre la superficie bacteriana que los aislados del ST838<sup>11A</sup>, sugiriendo que, entre los aislados PEN-R, el ST6521<sup>11A</sup> poseen una ventaja evolutiva para evitar la activación del sistema del complemento (Fig. 12). Estos resultados podrían explicar el incremento observado de episodios de ENI causados por los aislados ST6521<sup>11A</sup> PEN-resistentes frente al ST838<sup>11A</sup> (Fig. 9C y 10).



**Fig. 12. Depósito de C1q y C3b sobre la superficie bacteriana de los ST62, ST838 y ST6521 del serotipo 11A.** (A) Depósito de C1q. (B) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo del depósito de C1q. (C) IF del depósito de C3b. (D) Ejemplo de histograma de citometría de flujo del depósito de C3b. La curva control (de color rosa) muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero. El depósito de C1q y C3b se midió para 5 aislados clínicos diferentes de cada secuencitipo del serotipo 11A. Cada punto que se muestra representa el valor obtenido con una cepa del genotipo correspondiente. Se muestran valores de, al menos, 3–5 repeticiones para cada cepa. Las barras de error representan la DS y los asteriscos marcan las diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan los diferentes secuencitipos entre ellos, indicado por la barra horizontal (test *t* de Student dos colas; \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

Se ha descrito que el reclutamiento de reguladores negativos es una estrategia ampliamente utilizada por algunos microorganismos, entre ellos *S. pneumoniae*, para evadir la inmunidad mediada por el sistema del complemento (Lambris *et al.*, 2008). Por ello, a continuación, se investigó si los diferentes secuencitipos del estudio poseían una diferente capacidad de reclutar reguladores negativos de la cascada del complemento, pudiendo evadir así de manera diferente la activación del mismo. Se determinó la unión a los componentes C4BP y fH, que regulan la activación de la vía clásica y la vía alternativa, respectivamente. La unión de C4BP, pero no de fH, fue significativamente mayor en los aislados del ST62<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> en comparación con los aislados del ST838<sup>11A</sup> (Fig. 13). Estos resultados demostraron que la reducida opsonización por C1q y C3b en los aislados ST62<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> se debe, principalmente, a una mayor capacidad de los mismos para reclutar C4BP, el regulador negativo de la vía clásica. Por lo tanto, los resultados derivados de este estudio apoyan el incremento observado durante los últimos años de los casos de ENI causados por el ST6521<sup>11A</sup> PEN-R.



**Fig. 13 Unión de los reguladores negativos C4BP y fH.** (A) Depósito de C4BP sobre la superficie del ST62<sup>11A</sup>, ST6521<sup>11A</sup> y ST838<sup>11A</sup> de *S. pneumoniae*. (B) Histograma de citometría de flujo para la unión de C4BP. (C) Proporción de depósito del fH sobre el ST62<sup>11A</sup>, ST6521<sup>11A</sup> y ST838<sup>11A</sup> de *S. pneumoniae*. (D) Histograma de citometría de flujo para la unión del fH. La curva control (en rosa) muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero. La unión de C4BP y fH se midió para 5 aislados clínicos diferentes de cada genotipo del serotipo 11A. Los resultados se expresan como IF para la unión a C4BP y fH. Cada punto del gráfico representa el valor obtenido con una cepa del secuencitipo correspondiente. Se muestran valores de, al menos, 3–5 repeticiones para cada cepa. Las barras de error representan la DS y los asteriscos marcan las diferencias estadísticamente significativas en comparación con las cepas del ST838<sup>11A</sup> (test *t* de Student dos colas: \*,  $P < 0.05$ ).

### 1.5. Opsonofagocitosis del serotipo 11A

Para investigar la capacidad de los tres diferentes secuencitipos de evadir el reconocimiento por los neutrófilos humanos, se estudió la OP de los mismos empleando la línea celular HL-60 diferenciada a neutrófilos PMN. Para confirmar que las células se habían diferenciado correctamente a granulocitos en presencia de DMF, se determinó la expresión de CD11b (receptor de iC3b y cadena  $\alpha$  CR<sub>3</sub>) (Feldhaeusser *et al.*, 2015), que es un marcador granulocítico de diferenciación que demuestra la presencia del receptor del componente C3 en las células utilizadas (Fig. 14).

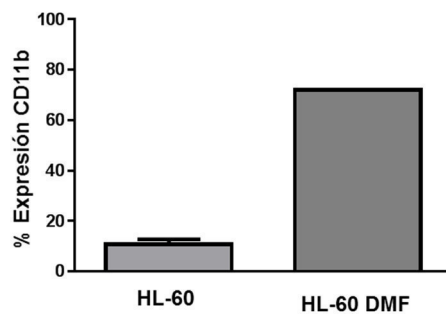
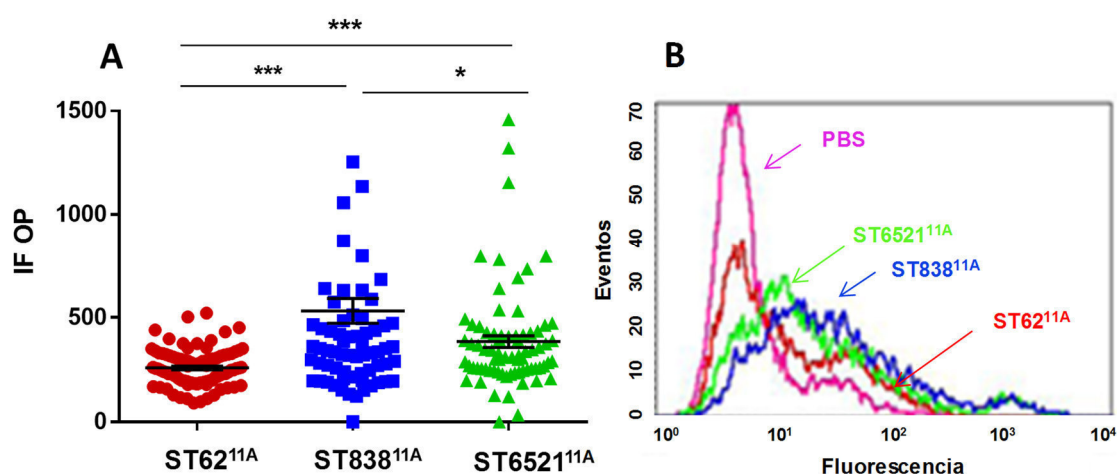


Fig. 14. Expresión del receptor CD11b en células HL-60 diferenciadas con DMF (100 mM) o células HL-60 no diferenciadas.

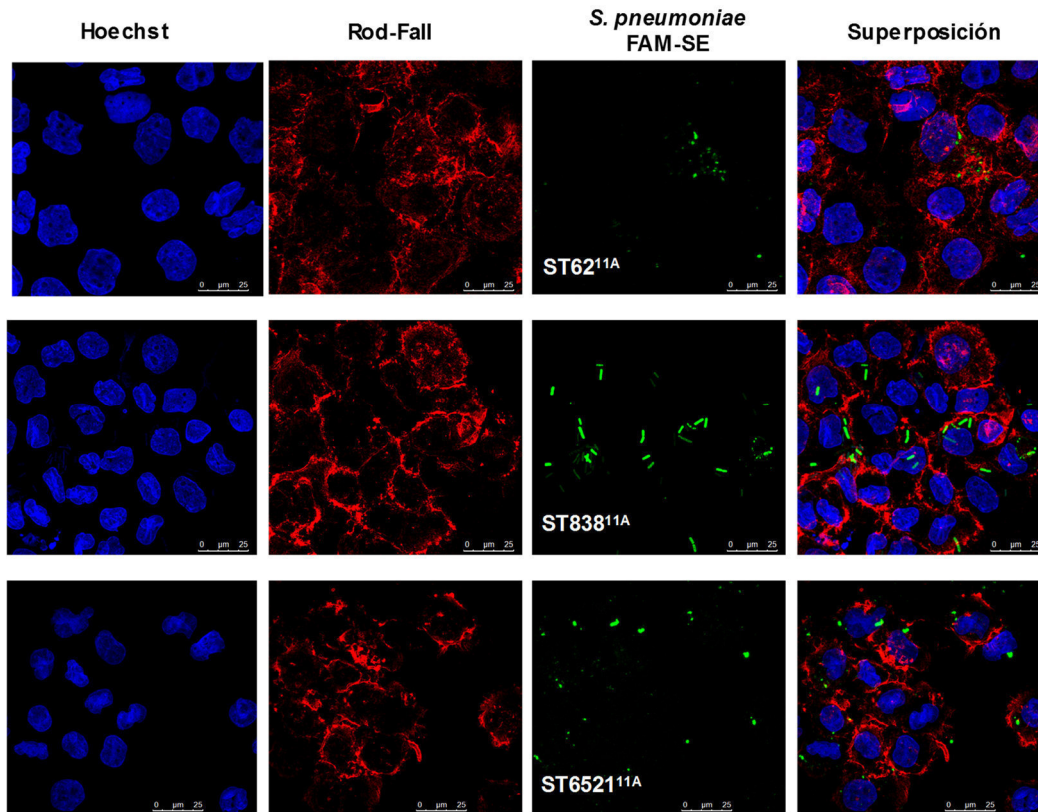
Los resultados mostraron que los aislados clínicos del ST62<sup>11A</sup> son más resistentes a la OP que los aislados del ST6521<sup>11A</sup> y ST838<sup>11A</sup> (Fig. 15.), lo que demuestra que el genotipo ST62<sup>11A</sup> es capaz de evadir más eficientemente la OP mediada por neutrófilos humanos. Entre los aislados PEN-R, el genotipo ST6521<sup>11A</sup> presentó una mayor capacidad para evitar la fagocitosis que el ST838<sup>11A</sup>.

La mayor evasión de la OP observada en los aislados clínicos del ST62<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> apoyan los datos observados tanto epidemiológica (Fig. 10) como experimentalmente mediante estudios de interacción con los componentes C1q y C3b del complemento (Fig. 12).



**Fig. 15. OP mediada por neutrófilos humanos de los diferentes secuencitipos del serotipo 11A de neumococo.** (A) IF de la proporción de bacterias fagocitadas. (B) Histograma de citometría de flujo. La curva control (en rosa) muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero. La OP se midió para 5 aislados clínicos diferentes de cada genotipo del serotipo 11A. Las barras de error representan la DS y los asteriscos representan los valores que son estadísticamente significativos en comparación con el secuencitipo susceptible a PEN (ST62<sup>11A</sup>) y entre los diferentes STs resistentes (test *t* de Student de dos colas; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).  $P < 0.001$  para la comparación global de la fagocitosis (test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnett).

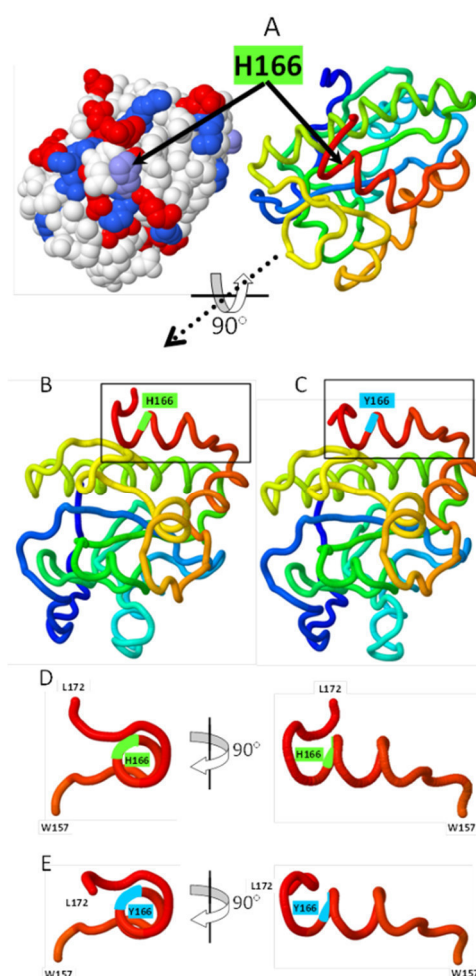
Estos resultados se complementaron con ensayos de CLSM. Las imágenes obtenidas corroboraron la mayor capacidad observada en los aislados clínicos del ST62<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> para resistir a la fagocitosis (Fig. 16). Estos resultados confirman que la mayor incidencia de casos de ENI producidos por estos dos genotipos se debe a una mayor eficiencia de los mismos evadiendo la inmunidad del hospedador en comparación a los aislados del ST838<sup>11A</sup>.



**Fig. 16. OP mediada por neutrófilos humanos de los diferentes secuencitipos del serotipo 11A de *S. pneumoniae* mediante CLSM.** (a–c) Marcaje de los núcleos mediante Hoechst (color azul). (d–f) Visualización del citoesqueleto de actina marcado en rojo con Rodamina-Faloidina (Rod-Fall). (g–i) *S. pneumoniae* marcado con FAM-SE (color verde). (j–l) Superposición de los tres canales.

### 1.6. Polimorfismo de la NAM-amidasa LytA

Se ha descrito que la NAM-amidasa LytA inhibe la inmunidad mediada por el sistema del complemento, así como el proceso de fagocitosis por un mecanismo dependiente e independiente de la liberación de Ply (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Para profundizar en el estudio y determinar las causas de las diferencias observadas entre los tres secuencitipos del serotipo 11A, se estudió el posible polimorfismo existente en la principal autolisina de neumococo (Morales *et al.*, 2010). Los aislados invasivos de los genotipos PEN-R, ST838<sup>11A</sup> y ST652<sup>11A</sup>, contenían un alelo *lytA* idéntico al observado, por ejemplo, en la cepa CGSP14 (CP001033). Por otro lado, entre los aislados invasivos del ST62<sup>11A</sup> se encontraron dos alelos, uno idéntico, por ejemplo, al de la cepa ATCC 700669 y otro al de la cepa AP200 (CP002121), un aislado del ST62<sup>11A</sup>. La única diferencia encontrada en la secuencia de LytA de los diferentes aislados fue en el residuo His166 que cambiaba por Tyr en los aislados del ST62<sup>11A</sup> (Fig. 17).

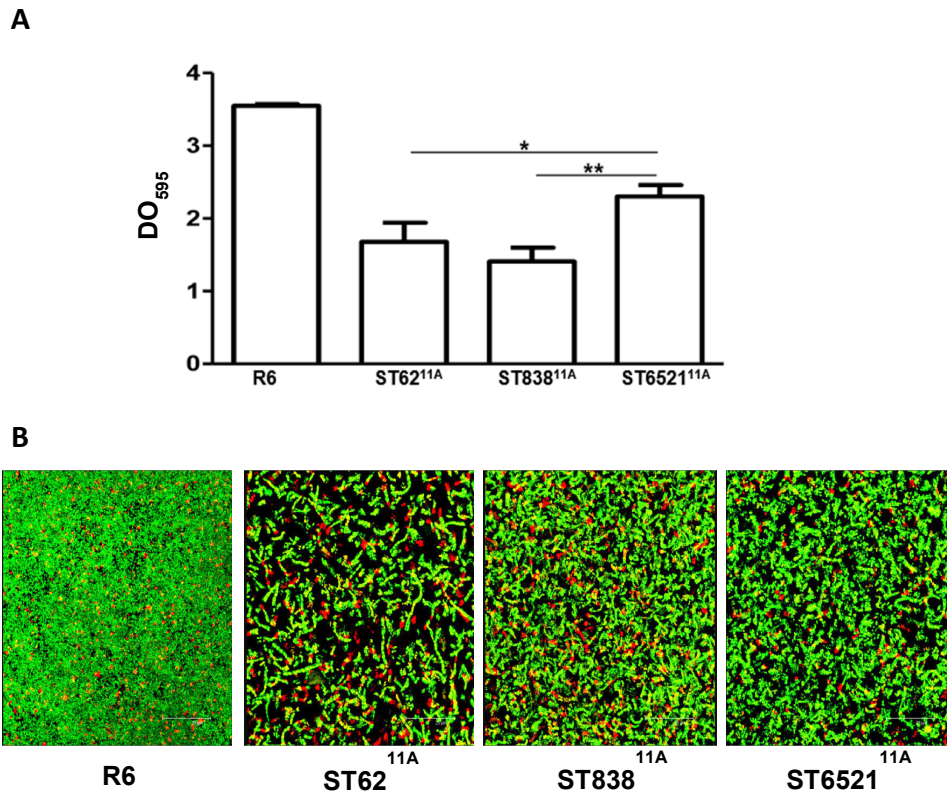


**Fig. 17. Polimorfismo de LytA en los aislados del serotipo 11A.** El dominio catalítico de la autolisina LytA (código PDB: 4ivv) se visualizó con FIRSTGLANCE en JMOL (<http://molvis.sdsc.edu/fgij/index.htm>). (A) El modelo muestra los residuos catiónicos (azul) y aniónicos (rojo), así como los residuos de His (indicados con esferas de color azul claro). Los residuos H166/Y166 se resaltan en verde o en azul, respectivamente. También se muestra la cadena del carbono  $\alpha$ . (B, C) Visión general del dominio catalítico de LytA mostrando el cambio predicho en su plegamiento debido a la presencia de His o Tyr en la posición 166. (D, E) Primer plano de las correspondientes  $\alpha$ -hélices.

### 1.7. Formación de biofilmes por los aislados invasivos del serotipo 11A

La formación de biofilmes protege a la bacteria de las adversidades del medio ambiente confiriéndole al microorganismo una resistencia aumentada frente a los tratamientos antimicrobianos y la respuesta inmune del hospedador, incluyendo la evasión de la inmunidad mediada por el complemento y la fagocitosis (Domenech *et al.*, 2013). Por ello, se investigó la formación de biofilm *in vitro* por los diferentes secuencitipos del serotipo 11A. La cepa R6 de *S. pneumoniae* se incluyó como control en este estudio. La capacidad de formar biofilm por los aislados del serotipo 11A fue significativamente menor que la observada para R6, probablemente, debido a las diferencias en la expresión de la cápsula, dado que la cepa R6 es una cepa no capsulada (Fig. 18). Cuando se comparó la formación de biofilm entre los diferentes

secuencitipos del estudio, los resultados mostraron que los aislados del ST6521<sup>11A</sup> y ST838<sup>11A</sup> presentaban mayor capacidad para formar biofilmes que los del ST62<sup>11A</sup>. Este hecho, junto con la mayor capacidad de evasión del sistema inmune por parte del ST6521<sup>11A</sup>, podría haber contribuido a la emergencia del genotipo PEN-R ST6521<sup>11A</sup> en los últimos años, como se comentó anteriormente. Los resultados obtenidos en este primer objetivo de Tesis Doctoral sugieren que los aislados clínicos del ST6521<sup>11A</sup> podrían tener una ventaja evolutiva para establecerse en el futuro como genotipo predominante dentro del serotipo 11A.



**Fig. 18. Formación de biofilmes de la cepa R6 de *S. pneumoniae* y los clones ST62<sup>11A</sup>, ST6521<sup>11A</sup> y ST838<sup>11A</sup>.** (A) Formación de biofilm por los diferentes aislados a las 6 h de incubación. Las barras de error representan la DS y los asteriscos representan los valores que son estadísticamente significativos en comparación con el secuencitipo susceptible a PEN (ST62<sup>11A</sup>) y entre los diferentes STs resistentes (test *t* de Student de dos colas; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ). (B) Microscopía confocal de la formación de biofilmes, teñidos con el kit *BacLight* que muestra las bacterias vivas (fluorescencia verde) y muertas (fluorescencia roja).

## 2. EFECTO A NIVEL BACTERIANO DE LA EXPOSICIÓN AL HT EN LA ENI

El hábito de fumar y, por lo tanto, la exposición al HT es un factor de riesgo que aumenta la susceptibilidad de padecer infecciones de las vías respiratorias, principalmente aquellas causadas por *S. pneumoniae*. Durante la combustión del tabaco se liberan numerosos componentes, algunos de ellos con alta capacidad mutagénica, que son inhalados por el sistema respiratorio. Las partículas inhaladas se depositan tanto el tracto respiratorio superior como inferior, lo que resulta en una inflamación crónica leve que puede progresar a enfermedad pulmonar crónica, como es la EPOC, por la exposición continuada al HT. Es bien conocido que el tabaquismo y las enfermedades derivadas del mismo están asociadas a un mayor riesgo de infecciones y la mayoría de las terapias van dirigidas a reducir la inflamación presente en estos pacientes (Garmendia *et al.*, 2012). Sin embargo, el efecto del HT en la presencia de bacterias colonizando persistentemente los pulmones de estos pacientes no está claro. En este sentido, existen evidencias que sugieren que la exposición al HT podría afectar a la expresión de ciertos genes en los microorganismos que colonizan el tracto respiratorio y, por tanto, a la virulencia de éstos (Bagaitkar *et al.*, 2010; Bagaitkar *et al.*, 2009; El Ahmer *et al.*, 1999; Mutepe *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que las personas fumadoras, tanto activas como pasivas, tienen una mayor predisposición a padecer episodios de ENI (Nuorti *et al.*, 2000). De esta manera, los pacientes con EPOC, que suelen ser personas fumadoras habituales o lo fueron en algún momento de su vida, tienden a sufrir episodios recurrentes de EAEPOC debido a infecciones por neumococo. Recientemente, se ha descrito que los aislados de los serotipos 11A y 16F de *S. pneumoniae* están más frecuentemente asociados a producir dichos episodios que agudizan la enfermedad en estos pacientes (Domenech *et al.*, 2011). Las exacerbaciones son un factor importante y adicional a la morbilidad y mortalidad causada por la EPOC, y son la principal causa de los grandes costes hospitalarios asociados a esta enfermedad (Garmendia *et al.*, 2012). Cabe destacar que estos serotipos de neumococo asociados a producir EAEPOC no están incluidos en la actual vacuna PCV13 por lo que podrían suponer una amenaza adicional en el futuro.

Sobre la base de lo expuesto anteriormente, para la realización de esta Tesis Doctoral se planteó como hipótesis que los aislados de neumococo presentes en individuos con EPOC podrían haber desarrollado cierta ventaja evolutiva para persistir largos periodos de tiempo en el pulmón de estos pacientes, probablemente, debida a la exposición continuada al HT. Por tanto, para llevar a cabo este estudio se seleccionaron aislados clínicos de los serotipos 11A y 16F de *S. pneumoniae*, debido a la asociación descrita anteriormente de éstos produciendo episodios de EAEPOC (Tablas 4 y 9). Estos aislados procedían, por un lado, de pacientes con EPOC catalogada como severa o muy severa, es decir, de los estadios GOLD III o IV (Tabla 2), y que presentaban un fenotipo persistente basado en, al menos, 56 días entre el aislamiento en el mismo paciente de una cepa del mismo serotipo y secuencitipo durante un nuevo episodio de EAEPOC (Tabla 9). Por otro lado, a modo comparativo, como cepas control se seleccionaron aislados clínicos de neumococo de los mismos serotipos, secuencitipo y perfil antibiótico, pero provenientes de pacientes con ENI (Tabla 3 y 9).

En el presente capítulo nos centraremos en comparar diferentes aspectos del proceso patogénico de los diferentes aislados clínicos de neumococo, procedentes de pacientes con EPOC o ENI y en determinar el impacto de la exposición continuada al HT en los mismos.

**Tabla. 9.** Aislados clínicos seleccionados para el estudio del efecto del HT en *S. pneumoniae*.

Nº de aislado	Diagnóstico	Estadio GOLD	Origen	Serotipo	ST	Resistencia antibiótica	Co-infección	Días entre episodios	Edad paciente	Diagnóstico episodio 2
3499	EAEPOC	IV	Espuito	11A	62	Susceptible	No	162	58	EAEPOC
8504	EAEPOC	IV	Espuito	11A	62	Sxt	PA,HI	105	73	EAEPOC
9027	EAEPOC	III	Espuito	11A	62	Susceptible	No	323	ND	EAEPOC
9755	EAEPOC	IV	Espuito	11A	6521	PSxt	No	157	60	EAEPOC
9904	EAEPOC	IV	Espuito	11A	6521	PSxt	No	140	60	EAEPOC
6804	EAEPOC	III	Espuito	16F	30	Susceptible	No	326	71	EAEPOC
7210	EAEPOC	IV	Espuito	16F	30	Sxt	MC	137	73	EAEPOC
8227	EAEPOC	IV	Espuito	16F	30	Sxt	No	56	65	EAEPOC
8282	EAEPOC	II	Espuito	16F	30	Susceptible	No	316	54	EAEPOC
9596	EAEPOC	IV	Espuito	16F	30	ECISxtCip	No	116	73	EAEPOC
3290	ENI	-	Sangre	11A	6521	PAmxCip	No	-	65	-
2442	ENI	-	LCR	11A	6521	PAmx	No	-	31	-
450	ENI	-	Sangre	11A	6521	PAmx	No	-	71	-
1181	ENI	-	Sangre	11A	62	Susceptible	No	-	85	-
881	ENI	-	LCR	11A	62	E	No	-	73	-
234	ENI	-	Sangre	16F	30	Susceptible	No	-	83	-
1571	ENI	-	Sangre	16F	30	Susceptible	No	-	86	-
1722	ENI	-	Sangre	16F	30	Susceptible	No	-	53	-
414	ENI	-	LCR	16F	30	Susceptible	No	-	53	-
1089	ENI	-	Sangre	16F	30	Susceptible	No	-	76	-

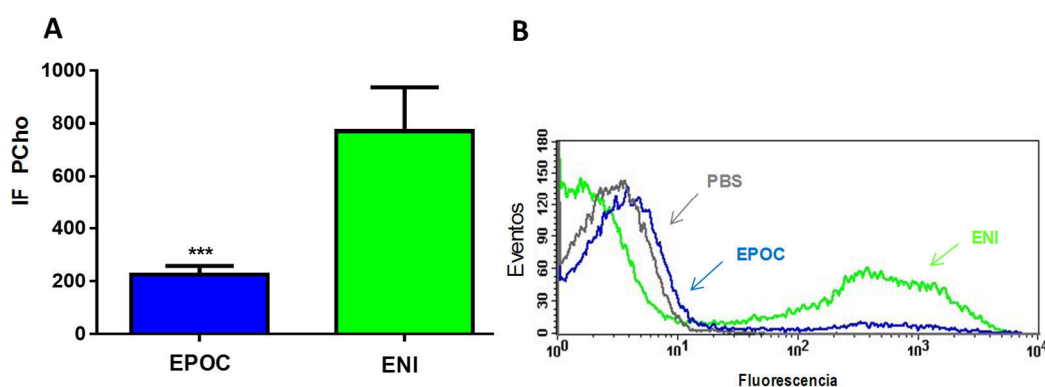
<sup>a</sup> Abreviaturas: PA (*P. aeruginosa*); HI (*H. influenzae*); MC (*M. catarrhalis*); ND (no disponible); LCR (líquido cefalorraquídeo); ST (secuencitipo); P (penicilina); Sxt (sulfametoxazol); E (eritromicina); Cl (cloranfenicol); Cip (ciprofloxacino); Amx (Amoxicilina); - (no procede para ENI).

## 2.1. Caracterización de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedador comparando aislados clínicos de pacientes con EPOC o ENI

### 2.1.1 Análisis del contenido de PCho en la superficie bacteriana

Los residuos de PCho de la superficie de neumococo sirven como anclaje para el grupo de proteínas de superficie de la familia de las CBP. La utilización de PCho para reducir la respuesta inmune a las infecciones, creando así una ventaja evolutiva, es una estrategia muy común para los microorganismos que la expresan (Clark y Weiser, 2013) (véase apartado 1.8.1 de la Introducción). El primer paso para tratar de comprender el fenotipo de cronicidad y persistencia pulmonar observado en los aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC consistió en medir por citometría de flujo el depósito de PCho en su superficie y se comparó con los niveles presentes en los aislados invasivos de neumococo (procedentes de pacientes con ENI).

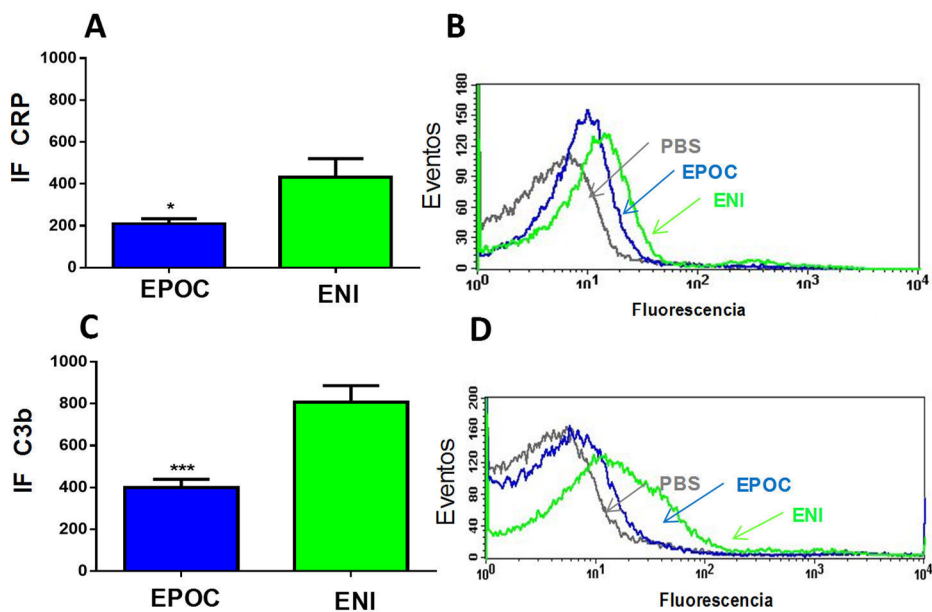
El contenido de PCho en la superficie bacteriana de los aislados de pacientes con EPOC fue significativamente menor en comparación al contenido observado en los aislados procedentes de ENI (Fig. 19), sugiriendo que los bajos niveles de este aminoalcohol podrían ser beneficiosos para las cepas crónicas de pacientes con EPOC, ya que les permitiría evadir mejor el sistema inmune y producir infecciones persistentes.



**Fig. 19. Contenido de PCho en la superficie bacteriana.** (A) Niveles de PCho expresados como índice de fluorescencia (IF). (B) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo del contenido de PCho. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado, procedentes de pacientes con EPOC o ENI. La curva control (gris) muestra los resultados de la bacteria incubada con PBS. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

2.1.2. Evasión del sistema del complemento

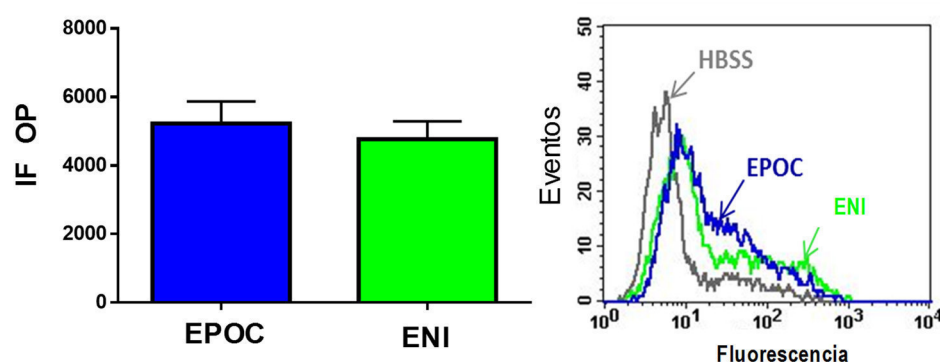
Como ya se ha comentado en la introducción de esta Memoria, la PCho es un componente de la pared celular de neumococo que es reconocida por proteínas de fase aguda, como CRP o SAP, que activan la inmunidad del complemento (Yuste *et al.*, 2007). Se ha descrito que CRP es un importante mediador en la activación de la vía clásica del complemento a través de C1q, lo que, además, conduce a una fagocitosis posterior mucho más eficaz (Suresh *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos al estudiar el depósito de PCho en la superficie bacteriana sugirieron que los aislados de neumococo de pacientes con EPOC, al presentar niveles más bajos de ésta, podrían evadir mejor la inmunidad mediada por el sistema del complemento. Se determinó el reconocimiento de los diferentes aislados de pacientes con EPOC o ENI por la principal proteína de fase aguda humana, CRP, así como la interacción de los mismos con el componente clave del complemento C3b. Los aislados de pacientes con EPOC fueron reconocidos de una manera menos eficaz por la pentraxina CRP que los aislados de pacientes con ENI (Fig. 20A). Además, el depósito de C3b sobre la superficie celular de los aislados procedentes de EPOC fue significativamente menor en comparación a los aislados responsables de ENI (Fig. 20B). Los resultados obtenidos, en conjunto, confirman que el bajo contenido en PCho (Fig. 19) de las cepas procedentes de pacientes con EPOC está asociado al menor reconocimiento de estos aislados por la inmunidad mediada por el sistema del complemento.



**Fig. 20. Reconocimiento por parte de CRP y C3b de los aislados procedentes de pacientes con EPOC o ENI.** (A) Depósito de CRP expresado como índice de fluorescencia (IF). (B) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo para el depósito de CRP. (C) Depósito de C3b expresado como IF. (D) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo para el depósito de C3b. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado, procedentes de pacientes con EPOC o ENI. La curva control (en gris) muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

### 2.1.3. Evasión de la opsonofagocitosis mediada por neutrófilos PMNs

*S. pneumoniae* es capaz de evadir la respuesta fagocítica del hospedador al interferir con el proceso de opsonización del complemento, evitando, de este modo, su posterior reconocimiento por las células fagocitarias (Kadioglu *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta los resultados observados anteriormente, basados en la interacción de los diferentes aislados con la inmunidad mediada por el complemento, se estudió la capacidad de los neutrófilos PMN para fagocitar los diferentes tipos de aislados clínicos. Para ello, se empleó la línea celular humana HL-60 diferenciada a granulocitos. Sin embargo, como se muestra en la figura 21, no se encontraron diferencias significativas en la OP entre las cepas de pacientes crónicos y las cepas de pacientes con ENI.



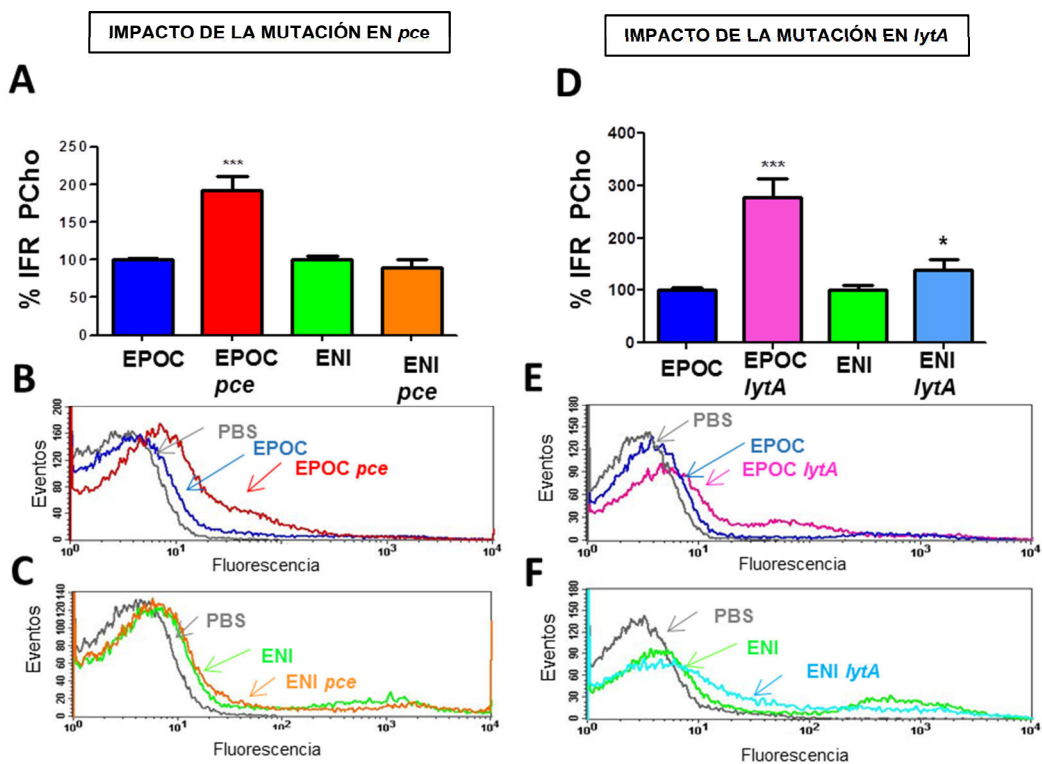
**Fig. 21. OP mediada por neutrófilos humanos de los aislados de *S. pneumoniae* procedentes de pacientes con EPOC o ENI.** (A) Fagocitosis de las cepas expresada como índice de fluorescencia (IF). (B) Histograma de citometría de flujo. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado, procedentes de pacientes con EPOC o ENI. La curva control (gris) muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero. Las barras de error representan la DS. Para el análisis estadístico se empleó el test *t* de Student de 2 colas.

### 2.1.4. Participación de Pce y LytA en la evasión del sistema del complemento comparando aislados clínicos de pacientes con EPOC o ENI

#### 2.1.4.1. Análisis del contenido de PCho en la superficie bacteriana

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en los niveles de PCho entre los dos tipos de aislados, se estudió si el menor depósito del mismo existente en las cepas EPOC podría deberse a que estas cepas presentasen una mayor actividad de las proteínas Pce y LytA, encargadas de modular el contenido en PCho en neumococo (Hermoso *et al.*, 2005; Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Para ello, se construyeron mutantes isogénicos en las proteínas Pce y LytA en varias cepas de cada tipo de aislado clínico (EPOC y ENI), pertenecientes tanto al serotipo 11A como al 16F (Tabla 4). Los mutantes empleados en esta Tesis Doctoral se obtuvieron mediante transformación genética a partir de DNA de mutantes *lytA* y *pce* previamente construidos en el laboratorio (Moscoso y Claverys, 2004). La ausencia de la proteína Pce se asoció a un aumento significativo del depósito de PCho en la superficie bacteriana en los aislados de pacientes EPOC

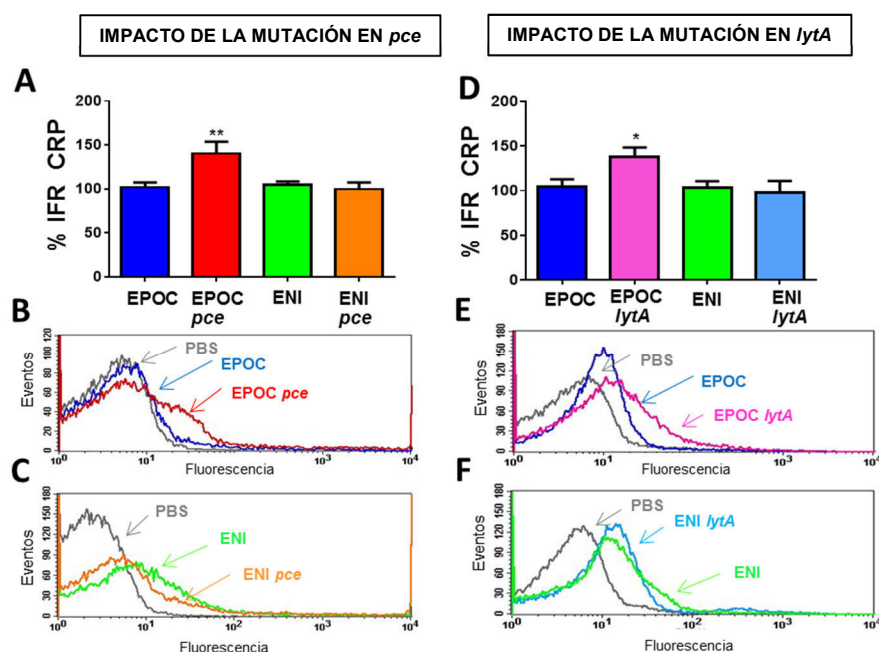
en comparación a las cepas silvestres y a los mutantes *pce* de las cepas de pacientes con ENI, en las cuales no se observó ningún efecto (Figs. 22. A–C). Por otro lado, en ausencia de *lytA* se produjo un aumento del depósito de PCho en la superficie bacteriana de ambos tipos de aislados en comparación con las cepas silvestres, aunque este aumento fue más significativo en los mutantes *lytA* de los aislados de pacientes con EPOC (Figs. 22 D–F). Estos resultados sugirieron que la Pce y LytA de los aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC podrían ser más eficaces reduciendo el contenido de PCho que los aislados procedentes de ENI, lo cual podría explicar la mayor persistencia de los aislados de neumococo presentes en individuos que sufren EPOC.



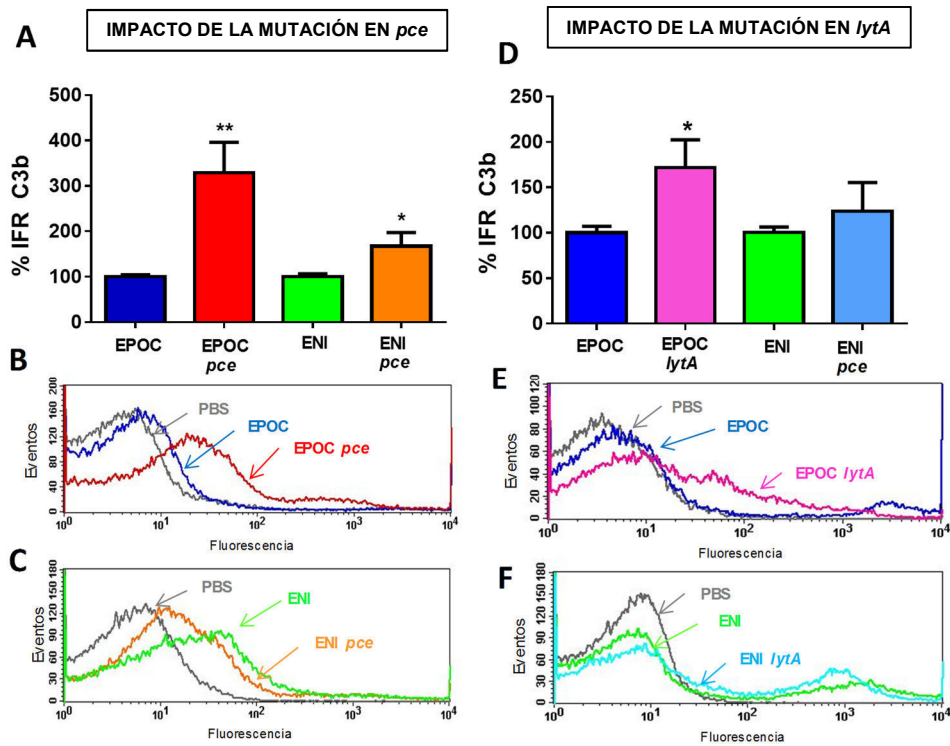
**Fig. 22. Efecto de Pce y LytA en el contenido en PCho en la superficie bacteriana.** (A) Contenido de PCho en la superficie bacteriana de las cepas silvestres de aislados EPOC, ENI y de sus respectivos mutantes isogénicos en *pce*. (B y C) Histogramas de citometría de flujo del contenido en PCho de las cepas silvestres de EPOC y ENI, respectivamente, y los mutantes isogénicos en *pce* en dichos aislados. (D) Contenido de PCho en la superficie bacteriana de las cepas silvestres de aislados EPOC, ENI y de sus respectivos mutantes isogénicos *lytA*. (E y F) Histogramas de citometría de flujo del contenido en PCho de las cepas silvestres de EPOC y ENI, respectivamente, y los mutantes isogénicos en *lytA* en dichos aislados. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado, procedente de pacientes con EPOC o ENI. La curva control (en gris) muestra los resultados de la bacteria incubada en PBS. El contenido en PCho se expresa como porcentaje de IFR, las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

2.1.4.2. Análisis del depósito del CRP y C3b en la superficie bacteriana

Una vez confirmado que las proteínas Pce y LytA de los aislados de pacientes con EPOC eran más eficaces modulando el contenido de PCho en la envoltura bacteriana, se estudió si la ausencia de estas proteínas afectaba al reconocimiento por los componentes CRP y C3b. La deficiencia de Pce, así como de LytA dio lugar a un incremento en el reconocimiento de los aislados de individuos con EPOC por la proteína CRP en comparación con las cepas silvestres, que no se observó en los aislados deficientes en estas proteínas procedentes de pacientes con ENI (Fig. 23). Resultados similares se observaron al estudiar el depósito de C3b sobre la superficie bacteriana de los diferentes aislados (Fig. 24). En ausencia de Pce y LytA el reconocimiento de neumococo por C3b se vio incrementado significativamente en los aislados de individuos con EPOC respecto a las cepas silvestres en comparación con los aislados de ENI en ausencia de estas proteínas (Fig. 24). Estos resultados apoyan la hipótesis de que los aislados de pacientes con EPOC podrían tener una mayor capacidad para persistir o cronificarse en el tracto respiratorio, al evadir mejor la inmunidad mediada por el sistema del complemento, a través de un mecanismo relacionado con una posible mayor capacidad de LytA y Pce para reducir el contenido en PCho.



**Fig. 23. Efecto de Pce y LytA en el depósito de CRP.** (A) Proporción de depósito de CRP en la superficie bacteriana de las cepas silvestres de aislados EPOC e invasivos y de sus respectivos mutantes isogénicos en *pce*. (B y C) Histogramas de citometría de flujo del depósito de CRP en las cepas silvestres de EPOC y ENI, respectivamente, y los mutantes isogénicos en *pce* en dichos aislados (D) Proporción de depósito de CRP en la superficie bacteriana de las cepas silvestres de aislados EPOC e invasivas; y de sus respectivos mutantes isogénicos en *lytA*. (E y F) Histogramas de citometría de flujo para las cepas silvestres de EPOC y ENI, respectivamente, y los mutantes isogénicos en *lytA* en dichos aislados. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado, procedente de pacientes con EPOC o ENI. La curva control (en gris) muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero. El depósito de CRP se expresa como porcentaje del IFR, las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).



**Fig.24. Efecto de Pce y LytA en el depósito de C3b.** (A) Proporción de depósito de C3b en la superficie bacteriana de las cepas silvestres de aislados EPOC e invasivos y de sus respectivos mutantes isogénicos en *pce*. (B y C) Histogramas de citometría de flujo del depósito de C3b en las cepas silvestres de EPOC y ENI, respectivamente, y los mutantes isogénicos en *pce* en dichos aislados (D) Proporción de depósito de C3b en la superficie bacteriana de las cepas silvestres de aislados EPOC e invasivas; y de sus respectivos mutantes isogénicos en *lytA*. (E y F) Histogramas de citometría de flujo para las cepas silvestres de EPOC y ENI, respectivamente, y los mutantes isogénicos en *lytA* en dichos aislados. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado, procedente de pacientes con EPOC o ENI. La curva control (en gris) muestra los resultados de la bacteria incubada sin suero. El depósito de C3b se expresa como porcentaje del IFR, las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

## 2.2. Impacto del HT en la infección neumocócica

### 2.2.1. Exposición de aislados clínicos de neumococo al efecto del HT

Como se ha comentado anteriormente en esta Memoria, la exposición continuada al HT es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la EPOC (Nuorti *et al.*, 2000). El tabaco facilita la colonización bacteriana de los pulmones y contribuye significativamente a las exacerbaciones asociadas a la EPOC (Grigg *et al.*, 2012). Para determinar el impacto del HT sobre *S. pneumoniae*, se decidió multiplicar los diferentes aislados clínicos del estudio durante 10 cultivos seriados sucesivos en presencia de 1% de EHT. De esta manera, con los aislados multiplicados o no en presencia de EHT, no sólo se pretendió evitar las diferencias en el fondo genético de los mismos (exceptuando las mutaciones casadas por la exposición al HT), sino también simular el efecto que produce sobre neumococo la exposición continuada a este factor de riesgo. Estos ensayos se realizaron tanto en aislados procedentes de pacientes con EPOC

como de ENI, con el objetivo último de poder observar si la exposición al HT modifica ciertos factores de virulencia de la bacteria que influyen en su patogenicidad (Fig. 25).

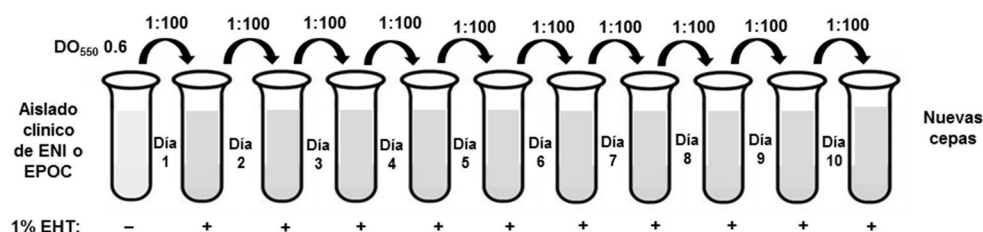
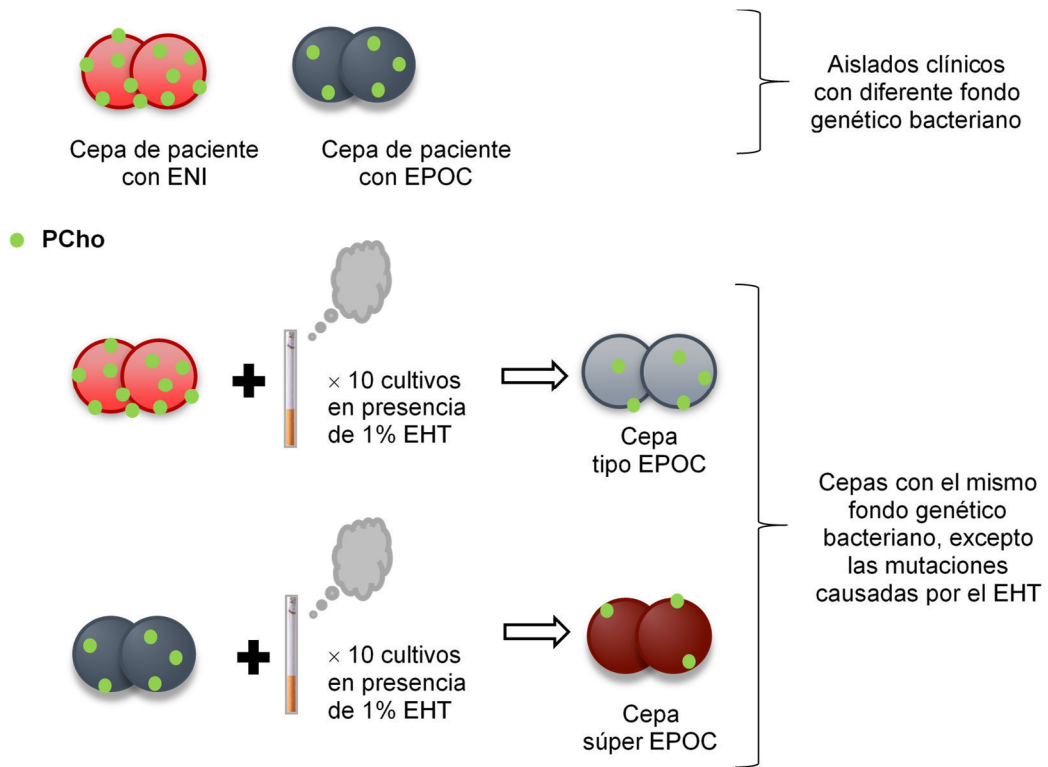


Fig. 25. Esquema representativo de la multiplicación de los aislados clínicos en presencia de 1% de EHT.

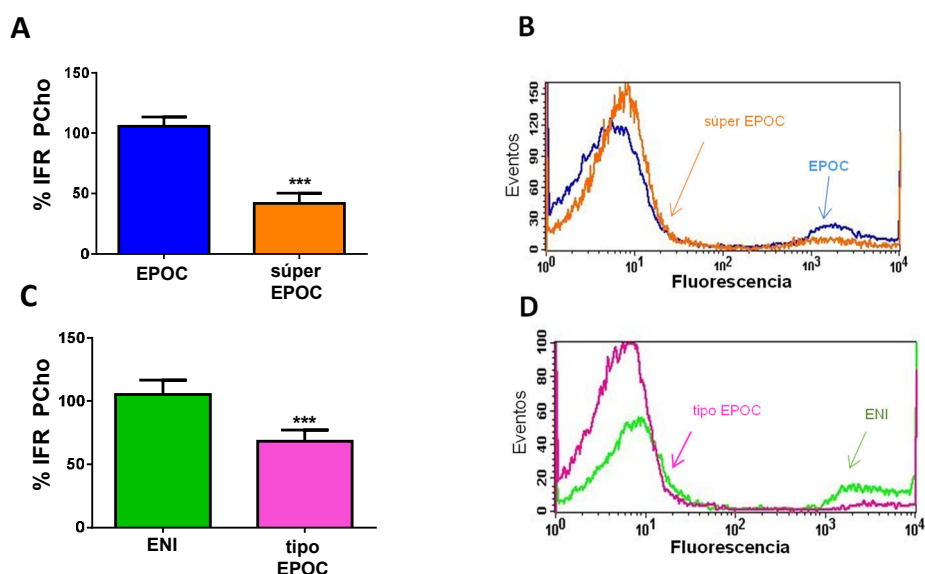
### 2.2.2. Análisis del contenido de PCho en la superficie bacteriana en aislados de pacientes con EPOC y aislados de pacientes con ENI expuestos a EHT

A la vista de los resultados obtenidos anteriormente se planteó que la exposición de neumococo al HT podría reducir los niveles de PCho de la superficie bacteriana, ya que los aislados obtenidos de pacientes con EPOC presentaban menos contenido de PCho que los aislados de pacientes con ENI. Por ello, tras la obtención de las nuevas cepas multiplicadas durante 10 pases en presencia de 1% de EHT, en una primera serie de experimentos se analizó el contenido de PCho comparando los nuevos aislados con las cepas silvestres procedentes de individuos con EPOC o ENI. Para poder distinguir estas nuevas cepas expuestas a EHT de los aislados originales, obtenidos de los distintos pacientes, en esta Tesis se ha utilizado la siguiente nomenclatura: los aislados de individuos con ENI expuestos a EHT se denominarán cepas tipo EPOC mientras que los aislados procedente de individuos con EPOC expuestos a EHT se denominarán cepas súper EPOC (Fig. 26).



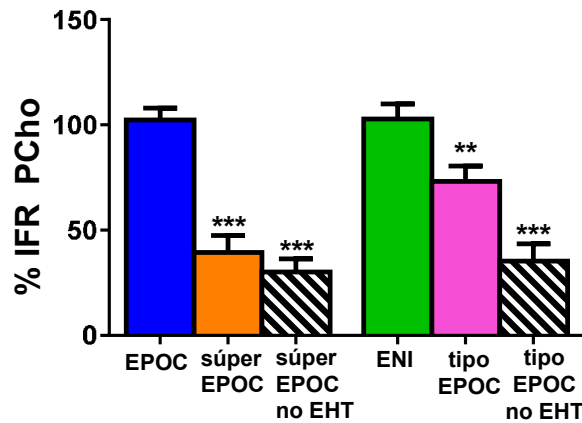
**Fig. 26. Esquema indicando posibles variaciones en los niveles de PCho en la superficie bacteriana de los aislados procedentes de ENI y EPOC tras la exposición a 1% de EHT durante diez cultivos bacterianos. Los círculos verdes representan los residuos de PCho.**

Los aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC o ENI que habían sido expuestos al EHT, súper EPOC y tipo EPOC, respectivamente, presentaron una reducción significativa del contenido de PCho en la superficie bacteriana en comparación a las cepas silvestres, no expuestas al EHT (Figs. 27 A y C).



**Fig. 27. Contenido de PCho en la superficie bacteriana de aislados EPOC, ENI, tipo EPOC y súper EPOC.** (A) Proporción del contenido de PCho en la superficie bacteriana en las cepas de EPOC antes y después de ser crecidas en presencia de 1% EHT (súper EPOC). (B) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo del contenido de PCho en la superficie de cepas de EPOC y súper EPOC. (C) Proporción del contenido en PCho en la superficie de cepas procedentes de ENI antes y después de ser incubadas en presencia de 1% EHT (tipo EPOC). (D) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo del contenido de PCho en la superficie de cepas ENI y tipo EPOC. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos del estudio tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado. El contenido de PCho se expresa como porcentaje del IFR, las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

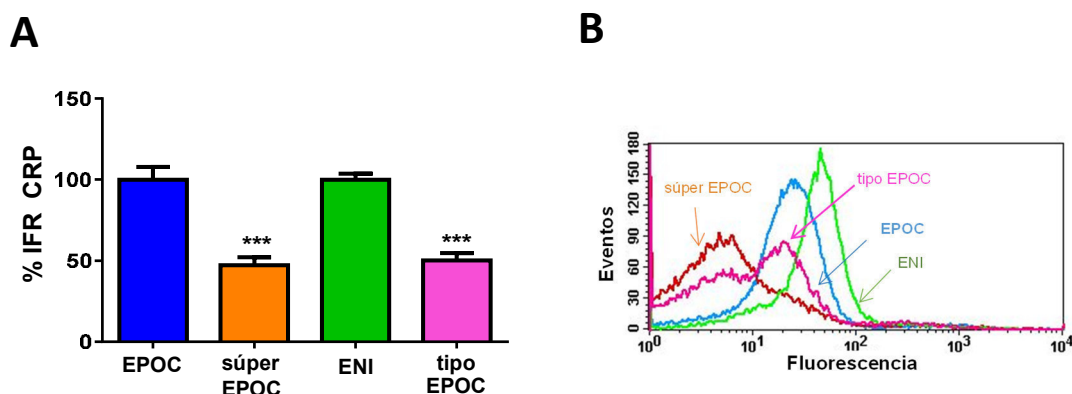
A continuación, para profundizar más en este hecho, se estudió si el fenotipo observado tras la exposición de los aislados a EHT era reversible. Esto es, se quiso determinar si estos cambios producidos por el HT afectaban a la expresión génica o si, por el contrario, eran cambios epigenéticos, que afectaban a los mecanismos de regulación genética sin implicar cambios en la secuencia de DNA. Para ello, se multiplicaron, de nuevo, las cepas tipo EPOC y súper EPOC en el medio de cultivo durante el mismo número de generaciones, pero en ausencia de EHT y se midieron los niveles de PCho en la superficie bacteriana de los diferentes aislados. Los resultados confirmaron que los cambios producidos por el HT en la bacteria no eran reversibles, de modo que las cepas tipo EPOC y súper EPOC multiplicadas en ausencia de EHT, mantuvieron los bajos niveles de PCho en la superficie bacteriana (Fig. 28).



**Fig. 28. Contenido de PCho en la superficie bacteriana de aislados de *S. pneumoniae*.** Proporción del contenido de PCho en la superficie bacteriana de las cepas procedentes de pacientes con EPOC y ENI, antes y después de ser multiplicadas en presencia de 1% de EHT (cepas denominadas súper EPOC y tipo EPOC, respectivamente). También se muestra (barras ralladas) el contenido en PCho de éstas últimas cepas tras ser multiplicadas, de nuevo, durante el mismo número de generaciones, pero en ausencia de EHT (súper EPOC no EHT y tipo EPOC no EHT). Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos tras analizar 1 aislado clínico de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado. El contenido de PCho se expresa como porcentaje del IFR con respecto a las cepas silvestres, las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

### 2.2.3. Reconocimiento de los aislados expuestos a HT por la proteína de fase aguda CRP

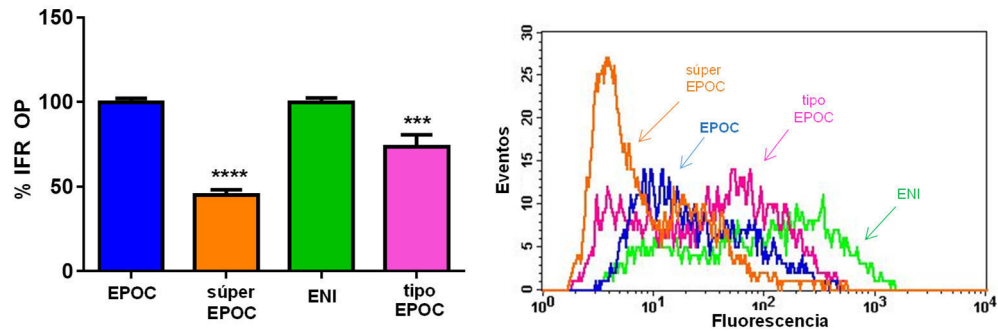
Con la finalidad de comprobar la relevancia de los hallazgos anteriores a nivel de reconocimiento por el sistema inmune, el siguiente paso fue estudiar si las nuevas cepas súper EPOC y tipo EPOC se comportaban igual que las cepas silvestres en su interacción con la inmunidad mediada por el complemento. Para ello, se determinó únicamente mediante citometría de flujo la interacción de los diferentes aislados objeto de estudio con la proteína CRP. Los resultados mostraron que las cepas que habían sido multiplicadas en presencia de EHT presentaban menor reconocimiento por la proteína de fase aguda CRP (Fig. 29). Estos datos reafirman, junto con los bajos niveles de PCho observados anteriormente en estos aislados, que el HT afecta al reconocimiento de *S. pneumoniae* por el sistema inmune.



**Fig. 29. Depósito de CRP en la superficie bacteriana de aislados de *S. pneumoniae* de pacientes con EPOC o ENI tras la exposición a 1% de EHT.** (A) Proporción del depósito de CRP. (B) Ejemplo de un histograma de citometría de flujo para el depósito de CRP. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado, y éstos se expresan como porcentaje del IFR con respecto a las cepas silvestres. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).

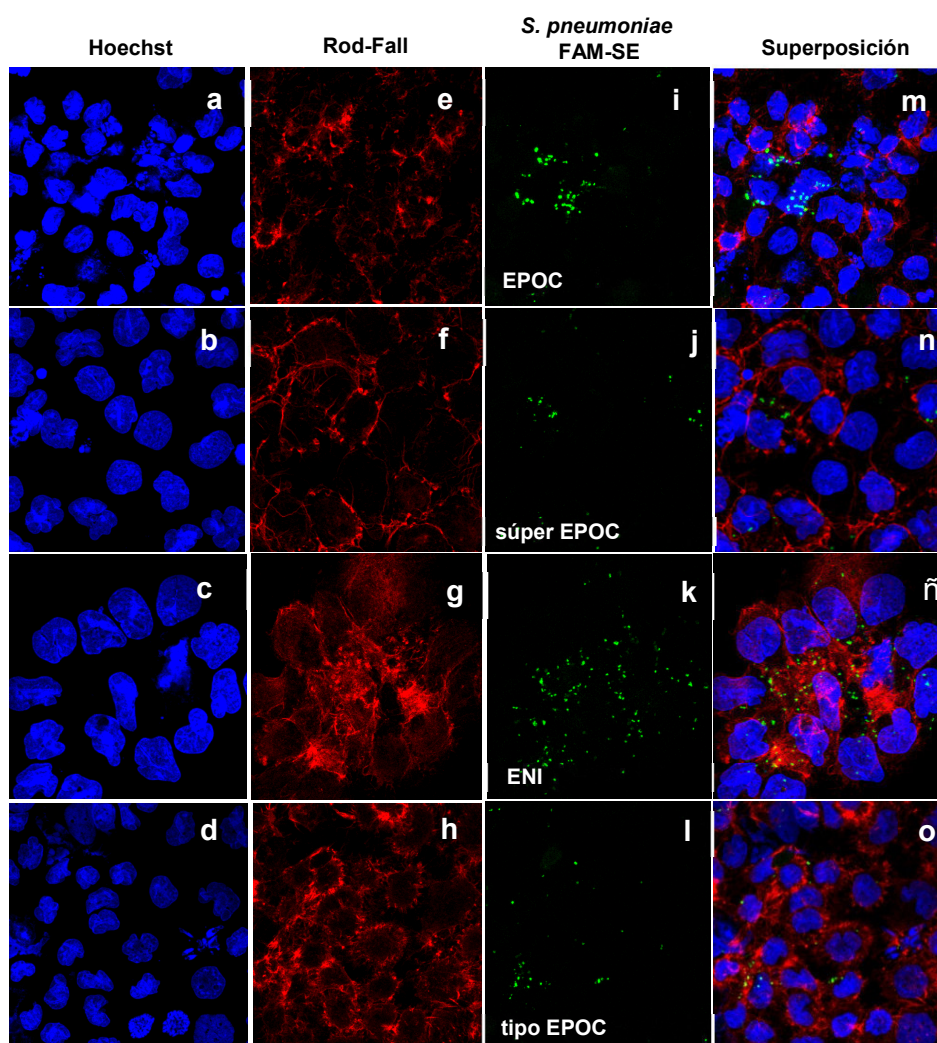
#### 2.2.4. Evasión de la opsonofagocitosis por neutrófilos polimorfonucleares

Se determinó la capacidad de las cepas súper EPOC y tipo EPOC de evadir la OP por neutrófilos PMN en comparación con los aislados silvestres, utilizando la línea celular humana HL-60 diferenciada a granulocitos (Martínez *et al.*, 1999). La OP de los aislados crecidos en presencia de EHT (súper EPOC y tipo EPOC) fue significativamente menor que la observada para las cepas silvestres (Fig. 30). Estos resultados contrastan con los mostrados en la figura 21 en la que se comparó la OP de aislados clínicos de pacientes con EPOC y ENI y no se observaron diferencias. Una posible explicación es que en los resultados de OP mostrados en la figura 30 se eliminaron (o redujeran) las variaciones debidas al diferente fondo genético de las cepas, ya que se comparó la OP entre aislados genéticamente relacionados, es decir las cepas de EPOC con las cepas obtenidas de la incubación de éstas en presencia de EHT (cepa súper EPOC) y la OP de las cepas ENI esas mismas cepas crecidas en presencia de HT (cepas tipo EPOC). Este hecho confirmó que la exposición a este agente mutagénico produce cambios en la bacteria que conllevan un incremento de la resistencia a la inmunidad del complemento y la fagocitosis, que podrían estar relacionados con la mayor persistencia de la bacteria en los pulmones de los pacientes con EPOC.



**Fig. 30. OP mediada por neutrófilos humanos de los aislados de *S. pneumoniae* procedentes de pacientes con EPOC o ENI, cepas súper EPOC y tipo EPOC.** (A) Fagocitosis por neutrófilos humanos. (B) Histograma de citometría de flujo. Los datos que se muestran son representativos de los resultados obtenidos del estudio tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado, y se expresan como porcentaje del IFR con respecto a las cepas silvestres. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ).

Los resultados de OP determinados mediante citometría de flujo se complementaron con ensayos de microscopía confocal. Las imágenes obtenidas (Fig. 31) corroboraron que la OP de *S. pneumoniae* disminuye cuando las bacterias han sido expuestas a 1% de EHT. Estos datos apoyan la hipótesis planteada, confirmando que la exposición al HT podría reducir los niveles de PCho de neumococo y, por tanto, su interacción con la inmunidad mediada por el sistema del complemento y la fagocitosis.



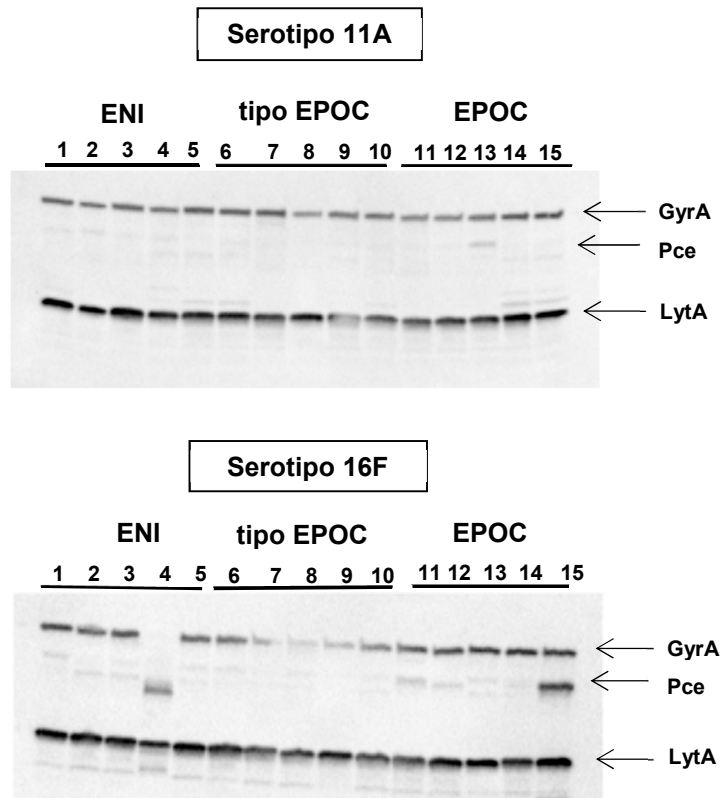
**Fig. 31.** Imágenes de CLSM de la OP de los aislados clínicos de neumococo de pacientes con EPOC o ENI, así como de las correspondientes cepas crecidas en presencia de EHT, denominadas súper EPOC y tipo EPOC, respectivamente. (a–d) Marcaje de los núcleos de las células HL-60 mediante Hoechst (color azul). (e–h) Visualización del citoesqueleto de actina mediante tinción con Rodamina-Faloidina (Rod-Fall) (color rojo). (i–l) Aislados de *S. pneumoniae* marcados con FAM-SE (color verde). (m–o) Superposición de los tres canales.

## 2.2.5. Caracterización de las proteínas LytA y Pce de las cepas EPOC, ENI y tipo EPOC

### 2.2.5.1. Cuantificación de Pce y LytA

Los resultados mostrados en el apartado 2.2 del presente capítulo, sugerían que las proteínas Pce y LytA de las cepas de pacientes con EPOC podrían contribuir a reducir el contenido de PCho de manera más eficaz que las mismas proteínas de las cepas de pacientes con ENI. Se decidió analizar mediante *western blot* si esta diferencia en la actividad enzimática podría deberse a variaciones en la cantidad de estas proteínas en los diferentes aislados. Como control de carga se empleó la subunidad GyrA de la DNA girasa, que se encuentra altamente conservada

en neumococo. El estudio de LytA no mostró diferencias en la cuantificación de la proteína entre los aislados de ENI, EPOC y tipo EPOC (Fig. 32). En relación a Pce, se realizaron diversos intentos para medir la proteína, de igual modo a los realizados para LytA, pero no se logró visualizar a ésta de un modo claro, quizás por la baja calidad y especificidad del anticuerpo utilizado.

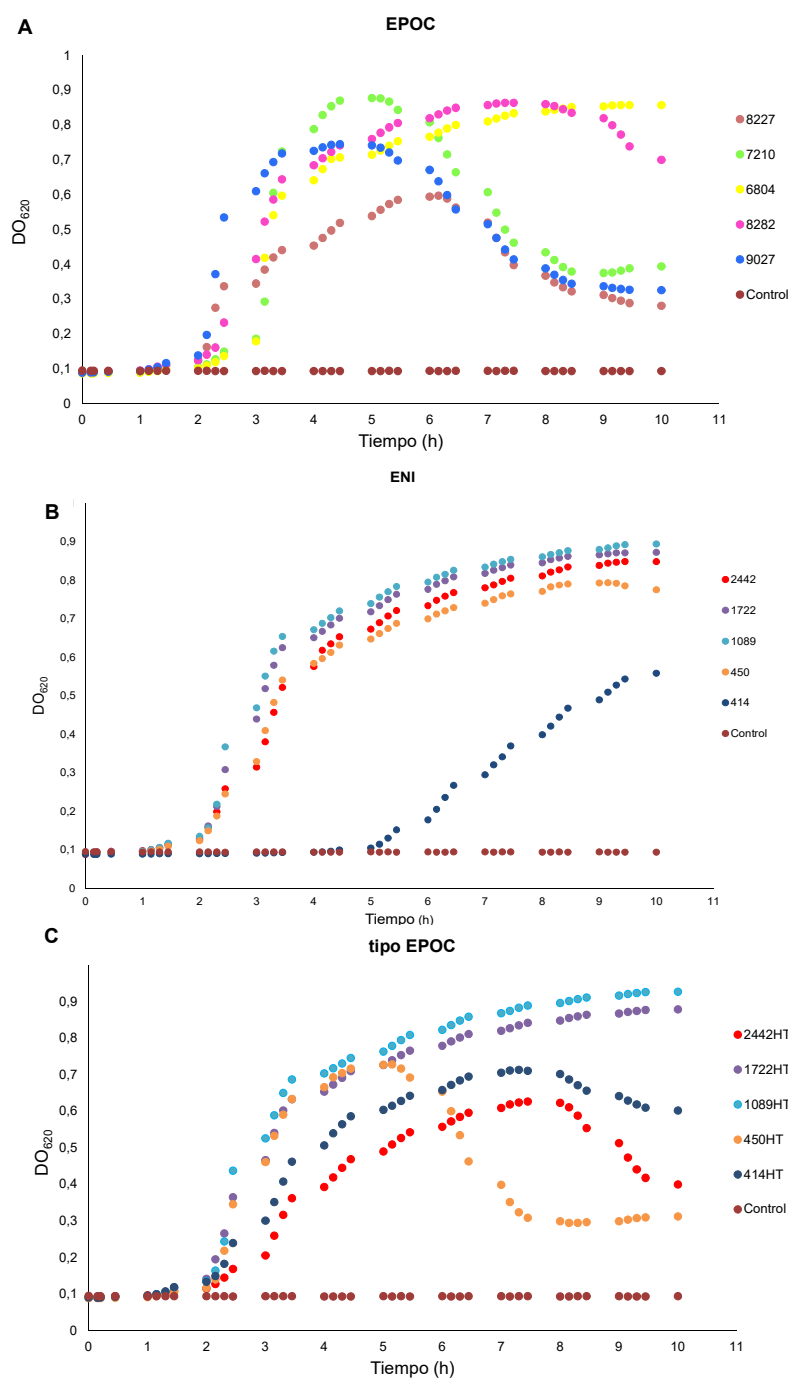


**Fig. 32. Detección mediante *western blot* de las proteínas Pce y LytA en aislados de EPOC, ENI y tipo EPOC de los serotipos 11A y 16F de *S. pneumoniae*.** (A) Aislados del serotipo 11A procedentes de ENI (carriles 1–5), cepas tipo EPOC (carriles (6–10), y aislados de EPOC (carriles 11–15). (B) Aislados del serotipo 16F procedentes de ENI (carriles 1–5), cepas tipo EPOC (carriles (6–10), y aislados de EPOC (carriles 11–15). Las flechas señalan la proteína de la subunidad GyrA de la DNA girasa (92 kDa), empleada como control de carga, la proteína Pce (70 kDa) y la NAM-amidasa LytA (36.5 kDa).

#### 2.2.5.2. Determinación de la actividad lítica de LytA en aislados EPOC, ENI y tipo EPOC

A pesar de que la cuantificación proteica de LytA mediante los ensayos de *western blot* comentados anteriormente no mostró diferencias entre los diferentes aislados, se planteó continuar examinando la actividad de esta enzima. Teniendo en cuenta que la NAM-amidasa LytA es la principal autolisina de *S. pneumoniae*, se estudió la curva del crecimiento bacteriano de los aislados expuestos o no a EHT, con el objetivo de determinar si la mayor eficiencia observada de la proteína en los aislados EPOC y tipo EPOC reduciendo el contenido en PCho de la superficie bacteriana, podría deberse a una mayor actividad lítica de la misma en dichos aislados.

Los resultados obtenidos demostraron que los aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC se lisaban antes que los procedentes de ENI (Figs. 33 A y B). Además, cuando los aislados ENI habían sido previamente expuestos a 1% de EHT (cepas tipo EPOC) la actividad lítica de la bacteria se vio incrementada en comparación con los aislados silvestres (Figs. 33 B y C). Estos resultados sugieren que la actividad lítica de la LytA sí se encuentra incrementada en los aislados de neumococo de pacientes con EPOC y expuestos a HT.



**Fig. 33. Curvas de crecimiento (y lisis) de los aislados procedentes de EPOC, ENI y cepas tipo EPOC de los serotipos 11A y 16F de *S. pneumoniae*. El ensayo se monitorizó por turbidimetría.**

### 3. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN AL HT EN LA ENI A NIVEL DEL HOSPEDADOR

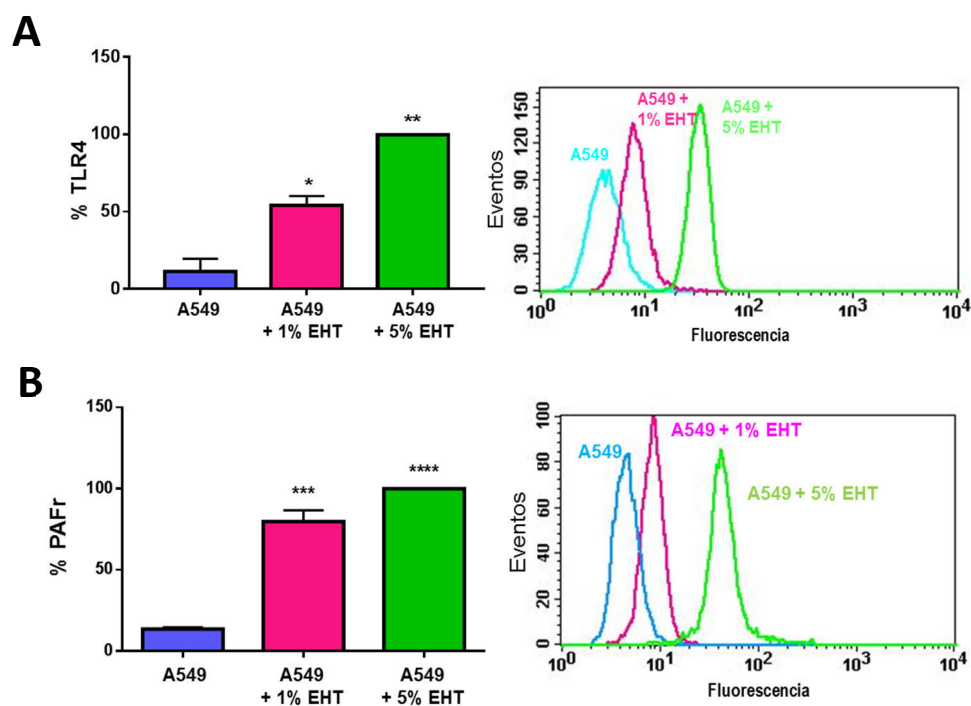
En individuos sanos, con una función pulmonar normal, el tracto respiratorio es capaz de mantener un equilibrio bien ajustado. El tracto respiratorio superior es colonizado de manera asintomática por la microbiota normal, mientras que el tracto respiratorio inferior se mantiene estéril (Garmendia *et al.*, 2012). Sin embargo, este equilibrio se puede ver alterado por la exposición a agentes externos, como es el HT. La exposición continuada al efecto del tabaco tiene efectos deletéreos en el hospedador que promueven el desarrollo de enfermedades respiratorias crónicas. Además, el HT posee efectos nocivos que alteran, en todos los niveles anatómicos, las interacciones entre el hospedador y el microorganismo, facilitando la colonización bacteriana de los pulmones y, de este modo, contribuyendo significativamente a los episodios de EA que sufren los pacientes con EPOC (Garmendia *et al.*, 2012; Sethi y Murphy, 2008). Comprender la naturaleza de la interacción hospedador-patógeno es esencial para el desarrollo de terapias efectivas, pero es importante considerar los cambios que se producen cuando el hospedador es expuesto a un agente externo como el HT. Como se ha comentado anteriormente en esta Memoria, las personas fumadoras están asociadas con más ingresos hospitalarios debidos, principalmente, al desarrollo de neumonía adquirida en la comunidad y ENI (Torres *et al.*, 2015). Sin embargo, las bases moleculares, celulares y/o inmunológicas por los que la exposición al HT aumenta la vulnerabilidad de estos individuos fumadores para desarrollar neumonías neumocócicas recurrentes son relativamente desconocidas. Este capítulo de la Tesis Doctoral se centra en determinar cómo la exposición a un agente externo y mutagénico como es el HT, afecta a la interacción de neumococo con el epitelio respiratorio humano, así como al reconocimiento por las células fagocíticas. Dado que la ENI se produce tras la interacción de la bacteria con receptores del hospedador, se investigó el impacto de la exposición al HT utilizando diferentes líneas celulares. Para ello, se analizó la expresión de distintos receptores celulares implicados en el reconocimiento del patógeno, así como la capacidad de los fagocitos profesionales para eliminar a neumococo.

#### 3.1. Análisis del efecto de la exposición a EHT en la interacción entre *S. pneumoniae* y el epitelio respiratorio

##### 3.1.1. Efecto del HT en la expresión de receptores del hospedador involucrados en la interacción con microorganismos patógenos

La EPOC se caracteriza por un incremento del número total de linfocitos T, que destaca por la presencia de altos niveles del receptor CD8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup> T) en el parénquima pulmonar y en el tracto traqueo-bronquial (O'Shaughnessy *et al.*, 1997) (Saetta *et al.*, 1998). Las células CD8<sup>+</sup>T se encuentran en las vías respiratorias, generalmente, localizadas en la submucosa y en el propio epitelio (Hamid *et al.*, 2004; Lofdahl *et al.*, 2008). Sin embargo, el papel de estas células en la patología de EPOC y los mecanismos por los cuales son reclutadas a los pulmones se desconocen. Además, se ha demostrado que en los pulmones de pacientes con EPOC se incrementa, entre otros receptores, la expresión de TLR4 y TLR9 en dichas células (Nadigel *et al.*, 2011). Otro receptor de interés tanto para la EPOC como para el desarrollo de la ENI es el PAFr. En fumadores activos, así como en células bronquiales expuestas a EHT, se ha descrito

que los niveles de PAFr se encuentran incrementados (Shukla *et al.*, 2016; Shukla *et al.*, 2014; Suri *et al.*, 2014). Esto podría ser de interés desde el punto de vista de la patogénesis de neumococo, ya que se ha propuesto que *S. pneumoniae* se une al PAFr e invade las células endoteliales dando lugar a ENI (Cundell *et al.*, 1995; Iovino *et al.*, 2013). En esta Tesis Doctoral, se analizaron los niveles de TLR4 y PAFr en cultivos de células epiteliales humanas de pulmón expuestas a diferentes concentraciones de EHT para dilucidar si la persistencia pulmonar observada en los aislados de pacientes con EPOC podría deberse a una menor interacción con este tipo de receptores. En primer lugar, se determinó la expresión del receptor TLR4 incubando la línea celular epitelial de pulmón A549 durante 18 h en presencia o ausencia de 1% o 5% de EHT. De la misma manera, se estudió la expresión del PAFr. Los resultados obtenidos confirmaron que la expresión de TLR4, así como de PAFr fue significativamente superior en las células epiteliales en presencia de EHT, siendo este efecto dependiente de la concentración del mismo (Fig. 34). No se observaron cambios morfológicos cuando se visualizaron las células en presencia o ausencia de EHT, ni la viabilidad bacteriana se vio alterada por la exposición a la concentración mayor, de 5% de EHT (datos no mostrados).

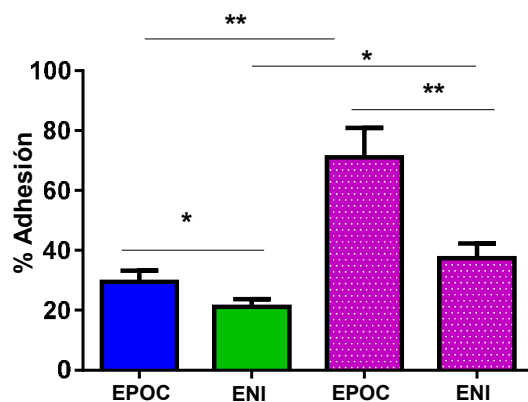


**Fig. 34. Análisis por citometría de flujo de la expresión de TLR4 y PAFr en células epiteliales de pulmón A549.** (A) Porcentaje de expresión de TLR4 y su correspondiente histograma de citometría de flujo. (B) Porcentaje de expresión del PAFr y su correspondiente histograma de citometría de flujo. La línea azul de los histogramas representa la expresión del receptor en células no expuestas a EHT, mientras que las líneas rosa y verde representan la expresión del receptor analizado en células A549 expuestas durante 18 h a 1% y 5% de EHT, respectivamente. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ).

### 3.1.2. Análisis del impacto del HT en la adhesión e invasión de las células epiteliales de pulmón

Para determinar el efecto de la exposición del epitelio respiratorio humano al HT en relación a la interacción con neumococo, se empleó la línea celular pulmonar A549. Se estudió la adhesión e invasión de los aislados de *S. pneumoniae* procedentes de pacientes con EPOC y ENI a estas células en presencia o ausencia de EHT. Para los ensayos de determinación del efecto del tabaco, se expusieron las células A549 a EHT diluido al 5% en el medio de cultivo y se incubaron durante 18 h. La adhesión bacteriana se cuantificó mediante la lisis de las células epiteliales, dilución seriada de los lisados con una solución de saponina-PBS (0.025%) y recuento de UFC en placas de agar sangre.

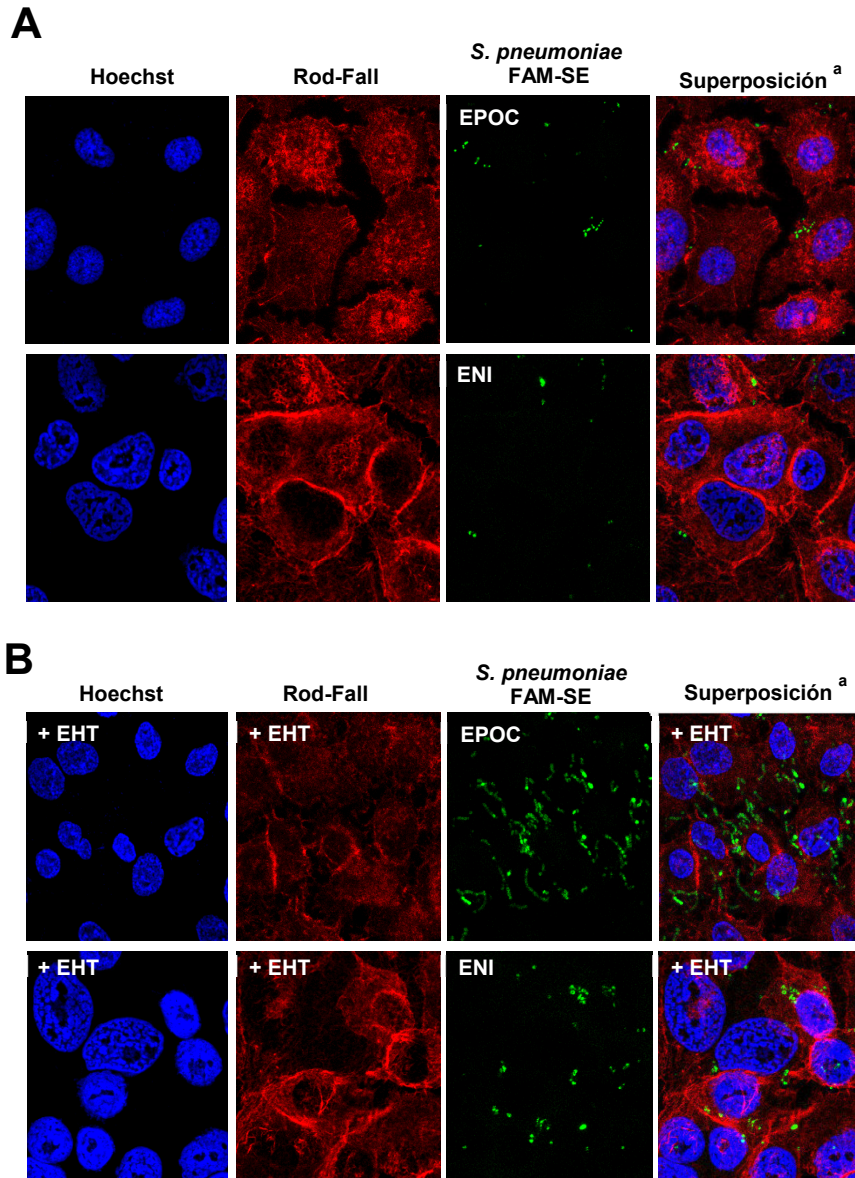
Los resultados obtenidos mostraron que la adhesión de los aislados de pacientes con EPOC a las células A549 fue mayor que la observada en los aislados de pacientes con ENI (Fig. 35). Además, la exposición de las células A549 a EHT aumentó no sólo la adhesión de ambos tipos de aislados clínicos respecto a las células no expuestas, sino que acentuó las diferencias observadas entre los mismos (Fig. 35). En las células expuestas a 5% de EHT, la adhesión de los aislados de neumococo procedentes de pacientes EPOC fue significativamente mayor a la de las cepas de pacientes con ENI (Fig. 35), apoyando la mayor persistencia pulmonar de los aislados de EPOC.



**Fig. 35. Adhesión de los aislados clínicos de pacientes con EPOC y ENI a las células A549 en presencia y ausencia de 5% de EHT.** Los experimentos de adhesión se realizaron utilizando células no expuestas (barras azul y verde) o expuestas a 5% de EHT (barras fucsias). Los datos están representados como porcentaje de adhesión respecto al inóculo y son representativos de los resultados obtenidos del estudio tras analizar 2 aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ).

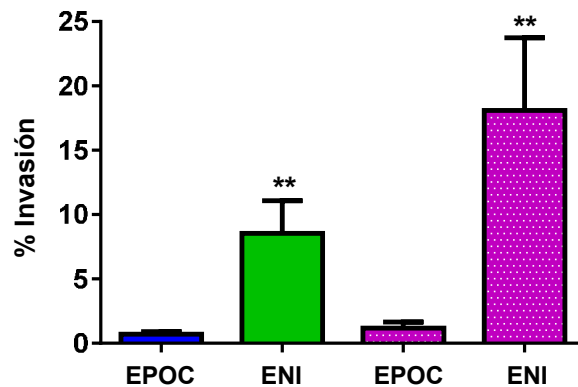
Estos resultados se complementaron con ensayos de microscopía confocal utilizando bacterias fluorescentes marcadas con FAM-SE. Las imágenes obtenidas corroboraron que las células pulmonares expuestas a EHT presentan mayores niveles de adhesión bacteriana en

comparación a las células no expuestas a EHT y confirmaron que los aislados de pacientes con EPOC se adhieren en mayor proporción a las células pulmonares en comparación con los aislados de pacientes con ENI (Fig. 36).



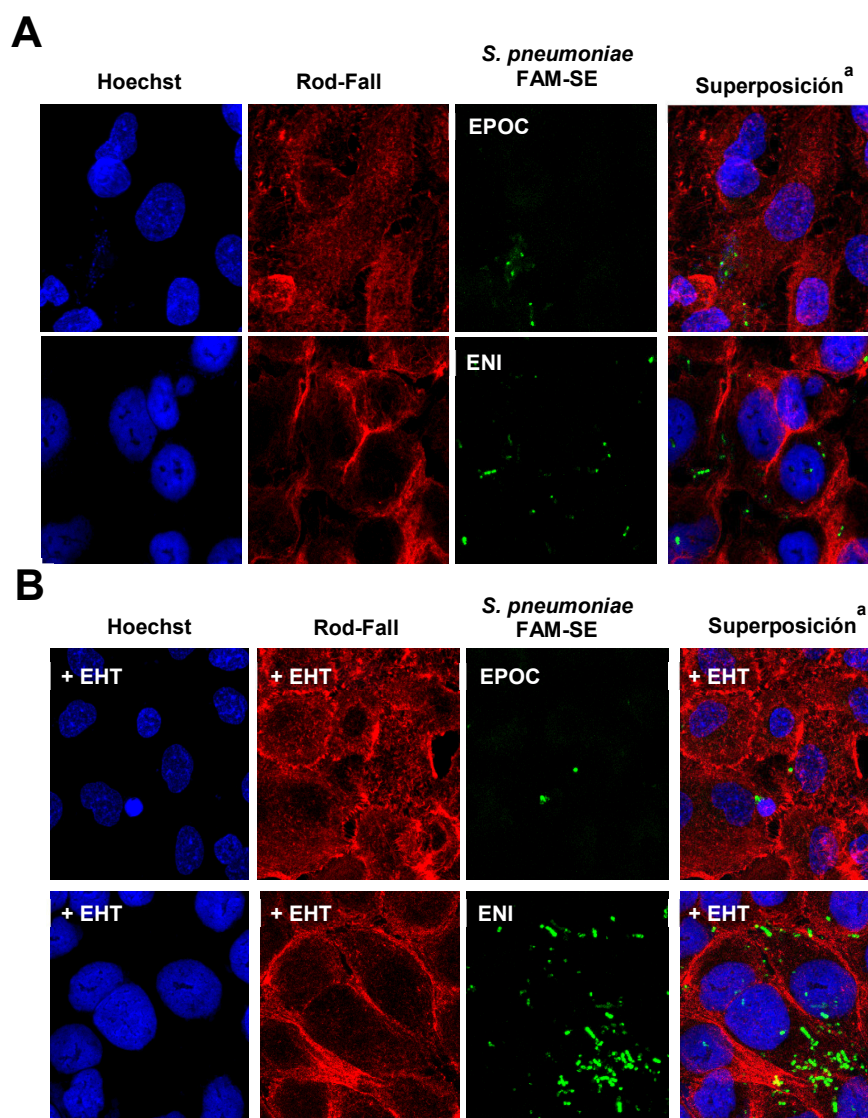
**Fig. 36. Adhesión a células A549 de los aislados de *S. pneumoniae* procedentes de pacientes con EPOC y ENI observado mediante CLSM.** Los experimentos de adhesión se realizaron utilizando células A549 no expuestas (A) o expuestas a 5% de EHT (B). Visualización del marcaje de los núcleos de las células epiteliales de pulmón mediante Hoechst (color azul) y del citoesqueleto de actina con Rodamina-Faloidina (Rod-Fall) (color rojo). Los aislados clínicos de *S. pneumoniae* procedentes de pacientes con EPOC o ENI se marcaron con FAM-SE y se observan en color verde.  
<sup>a</sup> Superposición de los tres canales.

A continuación, se determinó el efecto de la exposición a 5% de EHT en la invasión de *S. pneumoniae* a células A549. La invasión bacteriana se cuantificó mediante la lisis de las células epiteliales, dilución seriada de los lisados y recuento de UFC. Los resultados obtenidos confirmaron que los aislados procedentes de pacientes con ENI mostraron una mayor capacidad invasiva que los aislados de pacientes con EPOC, la cual fue significativamente más marcada cuando las células se expusieron a 5% de EHT (Fig. 37).



**Fig. 37. Invasión de células epiteliales pulmonares humanas A549 en presencia y ausencia de 5% de EHT de los aislados clínicos de pacientes con EPOC y ENI.** Los experimentos de invasión se realizaron utilizando células no expuestas (barras azul y verde) o expuestas (barras fucsias) a 5% de EHT. Los datos están representados como porcentaje de invasión respecto al inóculo y son representativos de los resultados obtenidos del estudio tras analizar dos aislados clínicos de cada serotipo (11A y 16F) y de cada tipo de aislado. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test t de Student de 2 colas; \*\*,  $P < 0.01$ ).

Estos resultados se confirmaron utilizando ensayos de CLSM. Las imágenes obtenidas apoyan la mayor invasión bacteriana a células A549 expuestas a EHT de los aislados de neumococo procedentes de pacientes con ENI (Fig. 38).

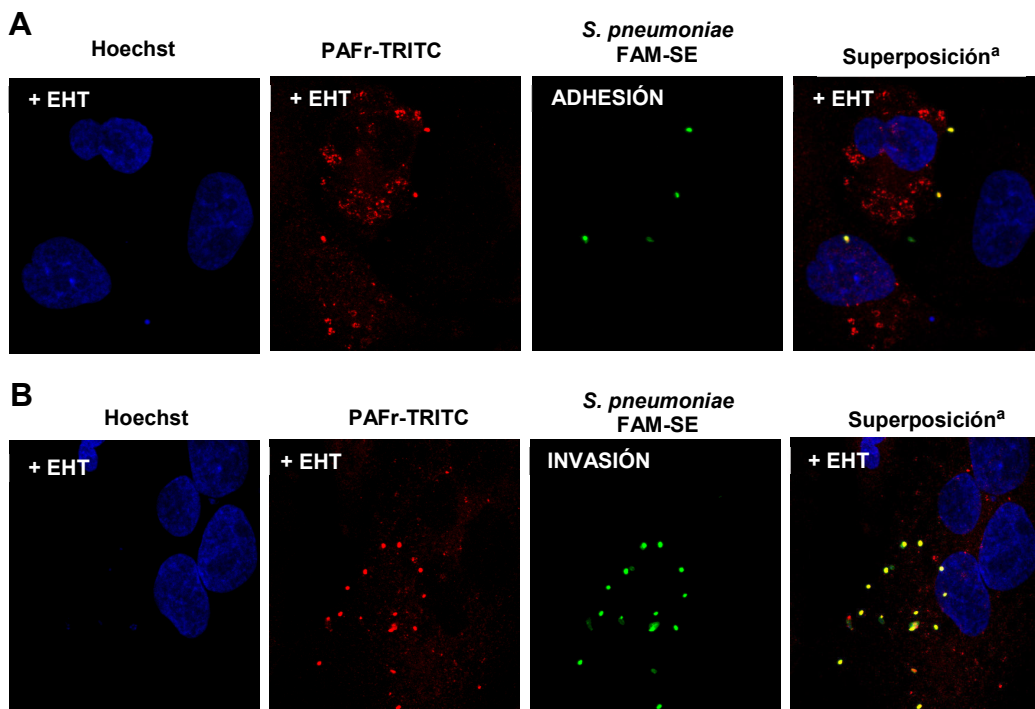


**Fig. 38. Invasión de células A549 de los aislados de *S. pneumoniae* de pacientes con EPOC y ENI.** Los experimentos de invasión se realizaron utilizando células no expuestas (A) o expuestas a 5% de EHT (B). Marcaje de los núcleos de las células epiteliales de pulmón mediante Hoechst (color azul). Visualización del marcaje de los núcleos de las células epiteliales de pulmón mediante Hoechst (color azul) y del citoesqueleto de actina con Rodamina-Faloidina (Rod-Fall) (color rojo). Los aislados clínicos de *S. pneumoniae* procedentes de pacientes con EPOC o ENI se marcaron con FAM-SE y se observan en color verde. <sup>a</sup> Superposición de los tres canales.

### 3.1.3. Interacción de los aislados de pacientes con ENI con el PAFr

La expresión del PAFr está incrementada en individuos fumadores (Shen *et al.*, 2016) y, de hecho, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, en células A549 expuestas a EHT confirman estos hallazgos (Fig. 34B). Esto es relevante desde el punto de vista de la diseminación de la bacteria desde el tracto respiratorio inferior a la circulación sistémica, ya que neumococo interactúa a través de la PCho de la superficie bacteriana con el PAFr (Cundell *et al.*, 1995). De hecho, una posibilidad que explicaría por qué los aislados de pacientes con ENI

invaden mejor las células A549 expuestas al EHT, podría ser la presencia en estos aislados de un mayor contenido de PCho en la superficie, como se ha demostrado en esta Tesis, lo que facilitaría la interacción con el PAFr de un modo más eficaz. Teniendo en cuenta estas evidencias, se estudió la interacción de neumococo con el epitelio pulmonar, analizando el papel del PAFr en los procesos de adhesión e invasión celular. Para ello, se infectaron células A549, previamente expuestas a 5% de EHT durante 18 h, con un aislado procedente de ENI y se visualizó mediante microscopía confocal (Fig. 39). Las imágenes obtenidas corroboran que en ambos procesos la bacteria interacciona con el receptor, observándose co-localización tanto en la fase inicial de adhesión al epitelio pulmonar (Fig. 39A) como en el proceso de invasión (Fig. 39B), donde es aún más visible dicha interacción. Estos resultados confirman que la presencia de niveles superiores de PCho en los aislados invasivos permite la invasión del epitelio pulmonar a través del PAFr.



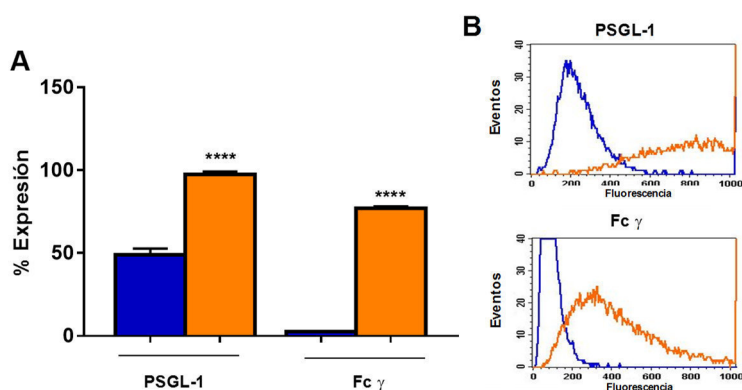
**Fig. 39. Interacción del aislado 1181<sup>11A</sup> de *S. pneumoniae*, procedente de un paciente con ENI, con el PAFr en un modelo de adhesión e invasión utilizando células A549 expuestas a EHT. (A) Adhesión. (B) Invasión. Marcaje de los núcleos de las células epiteliales de pulmón mediante Hoechst (color azul). Visualización de PAFr marcado con TRITC (color rojo). Aislado clínico 1181<sup>11A</sup> de *S. pneumoniae* procedente de ENI marcado con FAM-SE (color verde).  
<sup>a</sup> Superposición de los tres canales.**

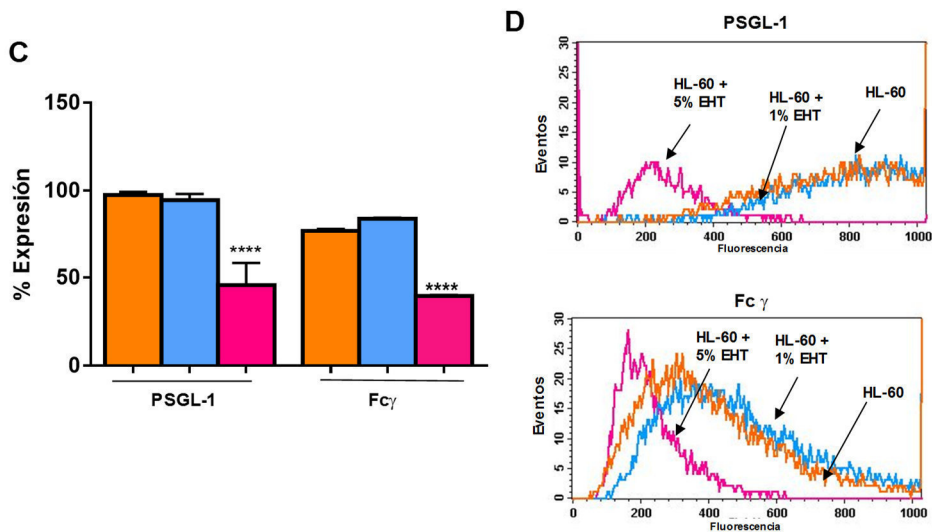
### 3.2. Estudio del efecto de la exposición a EHT en la interacción entre *S. pneumoniae* y receptores de las células fagocíticas

#### 3.2.1. Expresión del receptor PSGL-1 y Fc $\gamma$ en células fagocíticas en presencia de HT

La principal función efectora frente a la neumonía neumocócica es la fagocitosis mediada por neutrófilos. Las células HL-60 expresan los mismos receptores fagocíticos que los neutrófilos de sangre periférica, incluyendo CR1, CR3, Fc $\gamma$  y PSGL-1 entre otros, que son utilizados para fagocitar a neumococo (Romero-Steiner *et al.*, 1997). Los receptores Fc $\gamma$  son importantes en la fagocitosis de neumococo mediada por proteínas de fase aguda como CRP o SAP (Bharadwaj *et al.*, 2001; Mold *et al.*, 2001; Sorensen *et al.*, 1996; Ying *et al.*, 1993). Esto podría ser de interés, ya que estas proteínas reconocen la PCho presente en la superficie de *S. pneumoniae* e inducen la fagocitosis a través de dichos receptores. Recientemente, se ha descrito que, en ausencia de componentes opsonizantes del suero humano, el receptor PSGL-1 está implicado en el reconocimiento y eliminación de neumococo por los neutrófilos humanos (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016)

El siguiente paso en este estudio consistió en evaluar si la exposición al HT podría afectar a la expresión de los receptores PSGL-1 y Fc $\gamma$ , debido a la notable implicación de ambos en la ENI. En primer lugar, se analizó el nivel de expresión de éstos en células HL-60 antes y después de ser diferenciadas a neutrófilos PMN. La expresión de PSGL-1 en células no diferenciadas fue del 49% mientras que apenas se observó expresión de Fc $\gamma$  (Fig. 40A). Tras la diferenciación a neutrófilos, las células HL-60 incrementaron significativamente la expresión tanto de PSGL-1 como del receptor Fc $\gamma$ , siendo ésta del 97% y del 77%, respectivamente (Fig. 40A). Por tanto, la caracterización del impacto del HT en la expresión de estos receptores se realizó en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos PMN, que es cuando expresan la mayor proporción de los mismos. Para ello, las células fueron expuestas durante 24 h a EHT diluido al 1% y 5% en el medio de cultivo empleado. La expresión de ambos receptores disminuyó significativamente cuando las células se expusieron a 5% de EHT (Fig. 40B), indicando que el HT afecta negativamente a la expresión de PSGL-1 y Fc $\gamma$  y, por tanto, muy probablemente, a la funcionalidad de los mismos.





**Fig. 40. Expresión de los receptores PSGL-1 y Fc $\gamma$  en células HL-60.** (A) Porcentaje de expresión de ambos receptores en células HL-60 diferenciadas (barras naranjas) o no (barras azules) a neutrófilos PMN en presencia de DMF. (B) Histograma de citometría de flujo de la expresión de los receptores PSGL-1 y Fc $\gamma$  en células diferenciadas o no a neutrófilos PMN. (C) Porcentaje de expresión de PSGL-1 y Fc $\gamma$  en células HL-60 diferenciadas con DMF, expuestas o no a 1% y 5% de EHT durante 24 h. Las barras naranjas corresponden a la expresión de PSGL-1 y Fc $\gamma$  en células HL-60 no expuestas a EHT, mientras que las barras azules y rosas representan el porcentaje de expresión de ambos receptores en las células expuestas a las concentraciones de 1% y 5% de EHT, respectivamente. (D) Ejemplo de histograma de citometría de flujo de la expresión de ambos receptores en células HL-60 diferenciadas expuestas (o no) a 1% o 5% de EHT. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ).

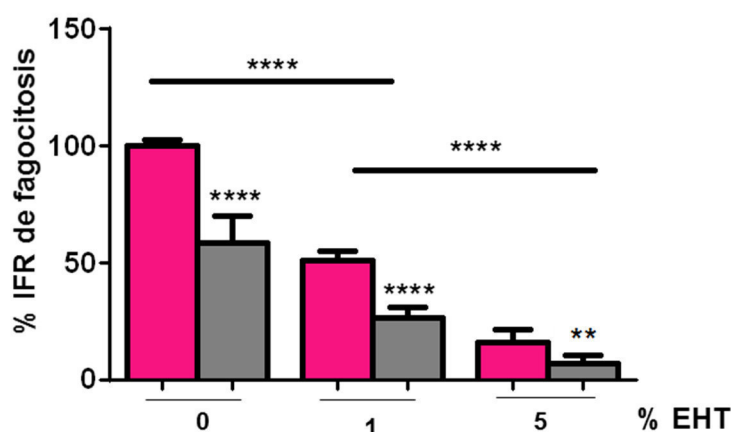
### 3.2.2. Efecto del HT en la fagocitosis de *S. pneumoniae* en ausencia de opsoninas del suero

Resultados previos de esta Tesis Doctoral han mostrado que la OP de *S. pneumoniae* disminuye cuando las bacterias han sido multiplicadas en presencia de 1% de EHT. Esto ocurre en las cepas tipo EPOC y súper EPOC, previamente opsonizadas con suero humano, confirmándose que son más resistentes a la OP que las cepas silvestres correspondientes (no expuestas a EHT) (Figs. 30 y 31). Teniendo en cuenta que la expresión del receptor PSGL-1 se ve afectada en presencia de EHT (Fig. 40), se planteó analizar el impacto del HT sobre la fagocitosis mediada por dicho receptor. Para ello, las células HL-60 diferenciadas a neutrófilos fueron expuestas a 1% y 5% de HT durante 24 h. Posteriormente, la infección se realizó con el aislado clínico 1722<sup>16F</sup>, procedente de un paciente con ENI, y con su respectiva cepa tipo EPOC (1722<sup>16FHT</sup>) pero en ausencia de suero como fuente de componentes opsonizantes con el fin de evitar la fagocitosis mediada por receptores del complemento.

En células HL-60 no expuestas a EHT la fagocitosis de la cepa tipo EPOC (1722<sup>16FHT</sup>) fue menor que la observada para su correspondiente cepa silvestre, procedente de un paciente con ENI (1722<sup>16F</sup>) confirmando que la exposición de neumococo a HT incrementa la resistencia de la bacteria a la fagocitosis por un mecanismo que es independiente de la presencia de opsoninas del suero (Fig. 41).

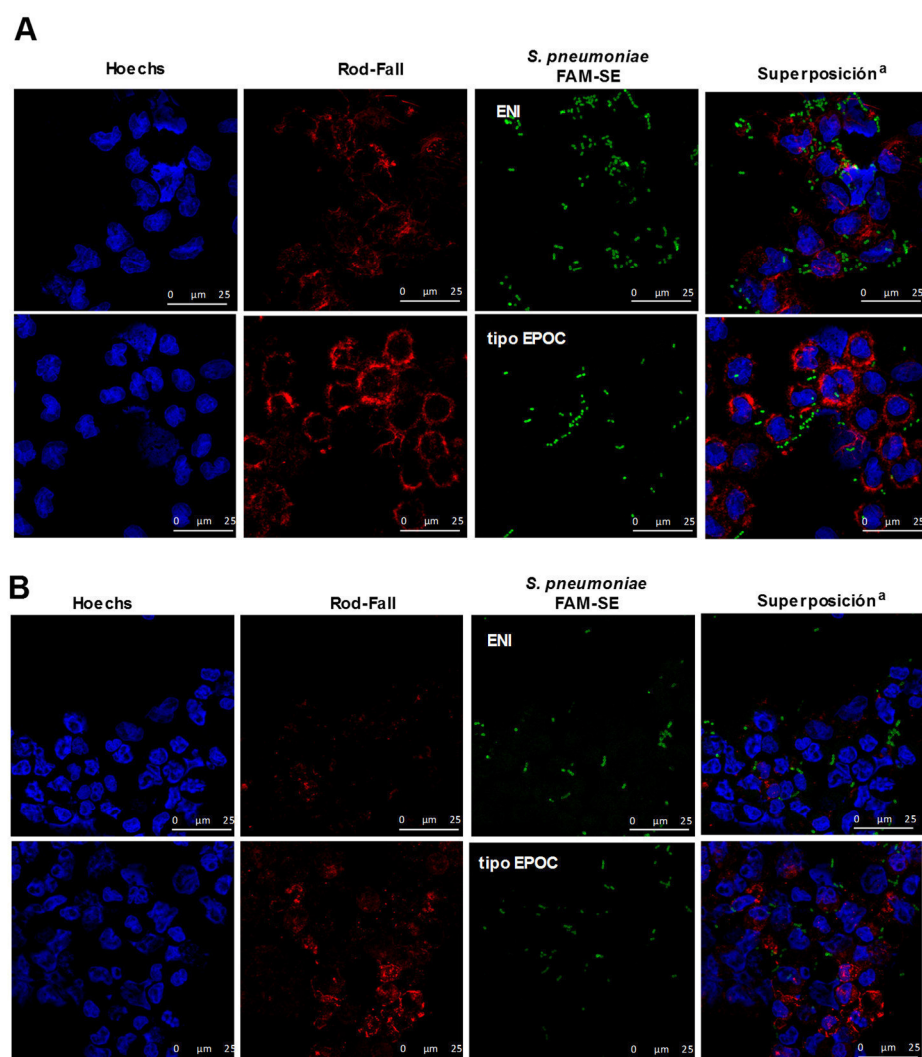
En células HL-60 expuestas a HT y en ausencia de componentes opsonizantes del suero, se observó una reducción de la fagocitosis tanto del aislado de ENI como de la cepa tipo EPOC,

siendo este efecto más acentuado para esta cepa tipo EPOC (Fig. 41). Además, la reducción de la fagocitosis fue dependiente de la concentración de EHT obteniendo un efecto más marcado en presencia de 5% de HT (Fig. 41). Esto es de gran interés desde el punto de vista de la fagocitosis inducida por PSGL-1, ya que, a dicha concentración de EHT, la expresión de este receptor estaba drásticamente reducida (Fig. 40). Estos resultados en conjunto indican que la exposición al HT impide el buen funcionamiento de la fagocitosis mediada por PSGL-1, favoreciendo la virulencia del microorganismo.



**Fig. 41. Fagocitosis del aislado 1722<sup>16F</sup>, procedente de un paciente con ENI, y su correspondiente cepa tipo EPOC mediada por células HL-60 diferenciadas a neutrófilos previamente expuestas o no a diferentes concentraciones de EHT.** Las barras rosas muestran el aislado 1722<sup>16F</sup> (ENI) mientras que las grises muestran el aislado 1722<sup>16F</sup> (tipo EPOC). Los valores están expresados como porcentaje del IFR. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ). Para la comparación de todas las cepas se utilizó un test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnet ( $P < 0.0001$ ).

Con el fin de confirmar los hallazgos anteriormente comentados, el estudio se complementó con experimentos de fagocitosis mediante microscopía confocal. Las imágenes obtenidas corroboraron que la fagocitosis de *S. pneumoniae* disminuye cuando las células diferenciadas a neutrófilos son expuestas a EHT (Fig. 42). En las células no expuestas se observó una mayor resistencia a la fagocitosis en el aislado tipo EPOC en comparación al aislado de ENI (Fig. 42A). Sin embargo, cuando las células fueron expuestas a EHT, la capacidad fagocítica de las mismas disminuyó para ambos tipos de aislados (Fig. 42B). En conjunto, los resultados del presente estudio ponen de manifiesto que la exposición de células fagocíticas del hospedador al efecto del HT afecta a la expresión de receptores como PSGL-1, que desempeña un papel crítico en el proceso de fagocitosis de neumococo, dificultando la capacidad de reconocimiento y eliminación del microorganismo. El hecho de que este proceso esté más acentuado en el caso de cepas tipo EPOC sugiere que los aislados de neumococo procedentes de estos pacientes o que han sido expuestos a HT, como es el caso de los fumadores, serán más resistentes al proceso de fagocitosis.

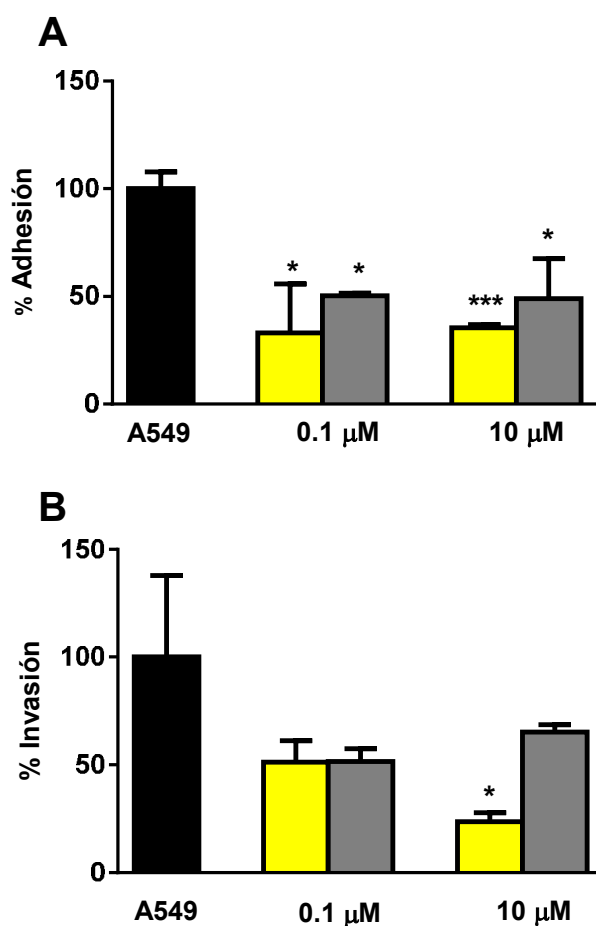


**Fig. 42. CLSM de la fagocitosis de *S. pneumoniae* mediada por neutrófilos humanos expuestos o no a EHT y en ausencia de componentes del suero.** Los experimentos se realizaron utilizando células HL-60 diferenciadas a neutrófilos no expuestas a EHT (A) o expuestas a 5% de EHT (B). Visualización del marcaje de los núcleos celulares mediante Hoechst (color azul) y del citoesqueleto de actina con Rodamina-Faloidina (Rod-Fall) (color rojo). Aislado de *S. pneumoniae* procedente de ENI (1722<sup>16F</sup>) o cepa tipo EPOC (1722<sup>16FHT</sup>) marcados con FAM-SE (en verde). <sup>a</sup> Superposición de los tres canales

### 3.3. Efecto de los corticoides en la infección neumocócica del tracto respiratorio

Existen discrepancias sobre el beneficio que puede suponer la utilización de corticoides frente a la infección por *S. pneumoniae*. La administración de estos fármacos es muy frecuente en pacientes con meningitis bacterianas agudas ya que reducen la respuesta inflamatoria producida por la infección. Además, su uso se ha relacionado con otros efectos beneficiosos como son la disminución del número de casos asociados a pérdida auditiva y la reducción de las secuelas neurológicas en los pacientes afectados. Sin embargo, su posible efecto reduciendo la mortalidad de la enfermedad aún no está claro (Brouwer *et al.*, 2013). De la misma manera, en pacientes

con EPOC, donde es habitual el tratamiento con ICS, existe cierta controversia sobre el efecto que puede tener el uso de éstos de manera prolongada (Barbier *et al.*, 2008). Numerosos estudios señalan que la administración de ICS incrementa los episodios de neumonía adquirida en la comunidad en estos pacientes, lo cual podría estar asociado al uso prolongado de estos fármacos (Calverley *et al.*, 2007; Ernst *et al.*, 2007; Ferguson *et al.*, 2008). En base a esto, se estudió la capacidad de dos corticoides diferentes, la dexametasona y la fluticasona, frente a la adhesión e invasión al tracto respiratorio de *S. pneumoniae*. Para este estudio se emplearon células A549 que fueron infectadas con el aislado 1722<sup>16F</sup>, procedente de un paciente con ENI. Los resultados mostraron que la exposición de las células a ambos tipos de corticoides redujo la adhesión de neumococo al epitelio respiratorio, observándose este efecto en ambas concentraciones analizadas (Fig. 43A). Asimismo, la exposición a estos corticoides, redujo la invasión de la bacteria a las células A549, siendo este efecto más marcado para la dexametasona que para la fluticasona a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  (Fig. 43B). Los resultados obtenidos sugieren que la administración de corticoides podría ser beneficiosa para los pacientes con EPOC, ya que dificultan la capacidad de neumococo para adherirse e invadir el epitelio respiratorio.



**Fig. 43. Adhesión e invasión de células A549 tratadas con corticoides por un aislado clínico de *S. pneumoniae* procedente de ENI.** Los experimentos de adhesión e invasión del aislado procedente de ENI 1722<sup>16F</sup>, se realizaron tras el tratamiento previo de las células con 0.1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de dexametasona (barras amarillas) o fluticasona (barras grises) durante 2 y 4 h, respectivamente. De manera comparativa, se midió la adhesión o invasión del aislado clínico en ausencia de tratamiento (barras negras). Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*,  $P < 0.05$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ ). Para la comparación de todas las cepas se utilizó un test de ANOVA de una vía seguido de un test de Dunnet ( $P < 0.0001$ ).

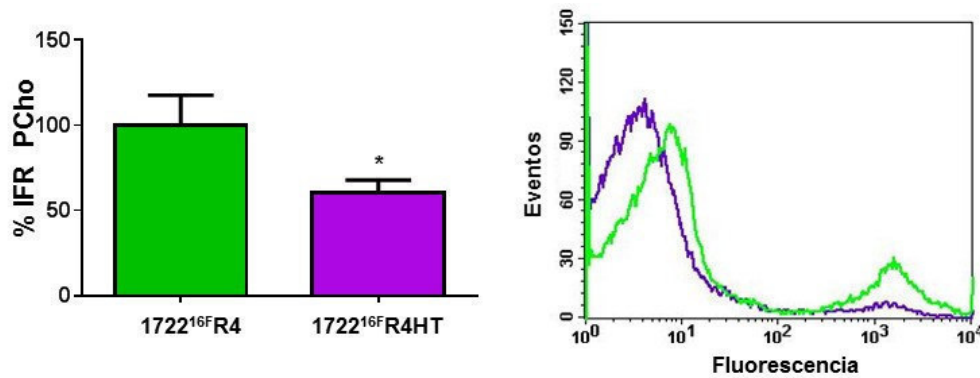
#### 4. MODELOS ANIMALES DE INFECCIÓN NEUMOCÓCICA E IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN AL HT EN LA VIRULENCIA DE NEUMOCOCO

##### 4.1. Modelo experimental de neumonía neumocócica

Uno de los principales problemas para poder establecer un modelo murino reproducible de infección neumocócica se basa en que los aislados clínicos de *S. pneumoniae* son poco virulentos en ratones y sólo determinados serotipos capsulares son capaces de producir ENI (Briles *et al.*, 1992). Para profundizar en el estudio de la persistencia pulmonar de los aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC, así como para estudiar el impacto del HT en la infección neumocócica, se inocularon dos aislados clínicos de neumococo de cada serotipo estudiado —11A y 16F— obtenidos de pacientes con EPOC o ENI, y una cepa tipo EPOC del serotipo 16F, en un modelo experimental de neumonía neumocócica. Sin embargo, acorde con lo descrito anteriormente, los aislados de los serotipos 11A y 16F inoculados por vía in fueron muy poco virulentos y, en ningún caso, fueron capaces de diseminarse al torrente sanguíneo y producir la muerte del animal (datos no mostrados).

Como se comentó en la Introducción de esta Memoria, neumococo es capaz de alterar la expresión de la cápsula dependiendo de la etapa del proceso patogénico en la que se encuentre, aumentando la expresión de ésta en el torrente sanguíneo y en los pulmones (Hergott *et al.*, 2015). En base a esto y con el objetivo de aumentar la virulencia de los aislados en modelos animales, se seleccionó la cepa 1722<sup>16F</sup>, aislado clínico procedente de un paciente con ENI que, aunque no produjo la muerte de ningún ratón, sí fue capaz de producir, al menos, cierto nivel de bacteriemia transitoria (datos no mostrados). Se realizaron sucesivas inoculaciones de esta cepa en grupos de ratones, con el fin de incrementar la expresión de la cápsula y, por tanto, mejorar su capacidad de virulencia (véase apartado. 11.2 de Materiales y Métodos). A partir del cuarto pase en ratón, el nuevo aislado, administrado por vía in, era capaz de producir infección severa ligada a la muerte de todos los animales de manera reproducible. Por lo tanto, los siguientes ensayos se realizaron con la nueva cepa, pasada por ratón cuatro veces, que se denominó 1722<sup>16FR4</sup>.

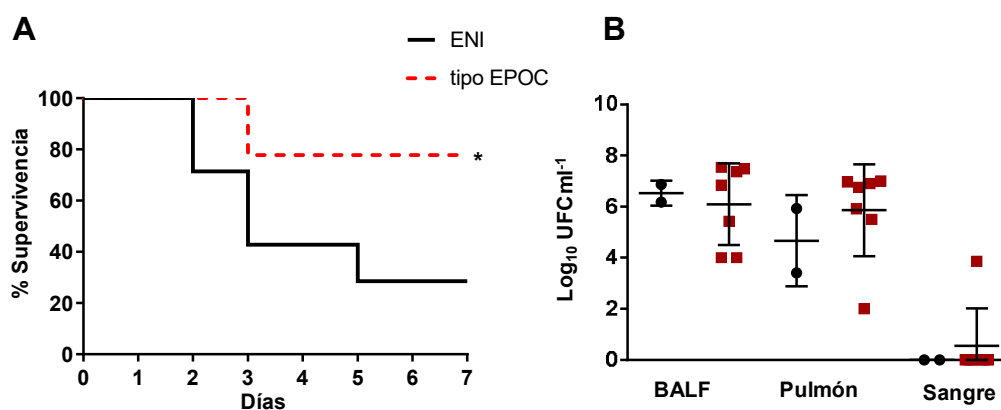
Para poder estudiar el efecto del HT en la virulencia de neumococo, se obtuvo la correspondiente cepa tipo EPOC a partir del aislado 1722<sup>16FR4</sup>. Para ello, la cepa 1722<sup>16FR4</sup> se multiplicó durante 10 cultivos sucesivos en presencia de 1% de EHT y se denominó 1722<sup>16FR4HT</sup>. Lo primero que se comprobó fue si 1722<sup>16FR4</sup> y 1722<sup>16FR4HT</sup> se comportaban igual que los aislados clínicos de pacientes con EPOC y tipo EPOC en cuanto a las variaciones observadas en los niveles de PCho. Se midió la cantidad de PCho de la cepa invasiva de ratón 1722<sup>16FR4</sup> y se comparó con los niveles presentes en la nueva cepa tipo EPOC de ratón. Los resultados obtenidos confirmaron que la cepa 1722<sup>16FR4HT</sup> presentaba niveles reducidos de PCho en comparación con la cepa invasiva de ratón 1722<sup>16FR4</sup> (Fig. 44).



**Fig. 44. Contenido de PCho en la superficie de las cepas 1722<sup>16F</sup>R4 y 1722<sup>16F</sup>R4HT.** El contenido en PCho se expresa como porcentaje del IFR, las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*,  $P < 0.05$ ).

Una vez demostrado que la cepa 1722<sup>16F</sup>R4HT se comportaba como una cepa de tipo EPOC, presentando niveles de PCho menores que los de la cepa invasiva 1722<sup>16F</sup>R4, se infectaron grupos de ratones por vía in con ambas cepas. Se analizó la tasa de supervivencia frente a la neumonía neumocócica determinando diariamente los niveles de bacteria en sangre, así como los registros de mortalidad y supervivencia durante un periodo de 7 días. Al finalizar el periodo de seguimiento, se sacrificaron los animales supervivientes con el fin de determinar los niveles de bacteria en BALF, pulmón y sangre.

La tasa de supervivencia que se observó frente a la neumonía producida por el aislado 1722<sup>16F</sup>R4HT fue del 78% frente al 29% de supervivencia en el grupo de ratones infectados con la cepa 1722<sup>16F</sup>R4 (Fig. 45A). La supervivencia observada en el grupo de los ratones infectados con la cepa tipo EPOC de ratón se asoció a altos niveles de bacteria en BALF y pulmón, a pesar de haber sobrevivido 7 días tras la infección (Fig. 45B). Estos resultados son compatibles con el fenotipo esperado en un aislado clínico capaz de producir enfermedad respiratoria crónica o persistente como ocurre en la EPOC, donde neumococo es una importante causa de neumonía no bacteriémica asociada de manera frecuente a neumonías recurrentes no invasivas en el mismo paciente.



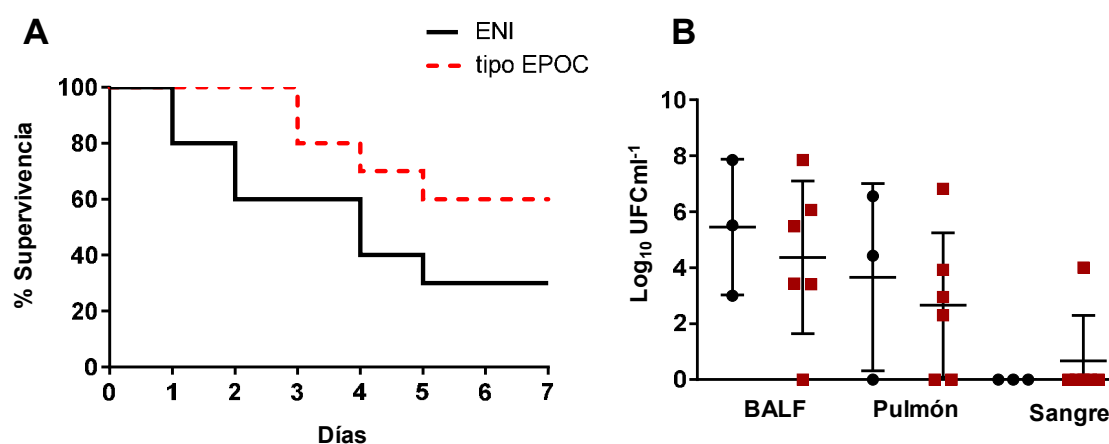
**Fig. 45. Modelo murino de neumonía neumocócica causado por las cepas 1722<sup>16F</sup>R4 y 1722<sup>16F</sup>R4HT.** (A) Niveles de supervivencia en ratones CD-1 durante 7 días tras la infección. La línea negra representa los ratones infectados con la cepa invasiva pasada por ratón 1722<sup>16F</sup>R4 y la línea roja discontinua a los ratones infectados con la cepa tipo EPOC 1722<sup>16F</sup>R4HT. (B) Recuento bacteriano en BALF, pulmón y sangre de ratones infectados que sobrevivieron a los 7 días de seguimiento. Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los resultados que son estadísticamente significativos. \*;  $P < 0.05$  (test de Mantel-Cox).

## 4.2. Modelo murino expuesto a EHT

### 4.2.1. Modelo murino de neumonía neumocócica en ratones expuestos a EHT

Para determinar el impacto del HT en un modelo *in vivo* y simular lo que podría suceder en pacientes con EPOC, los cuales, como se ha comentado en repetidas ocasiones, son personas que han sido fumadoras habituales o siguen siéndolo, se utilizaron grupos de ratones a los que se les administró diariamente EHT puro por vía in durante 3 semanas. Pasado este tiempo de exposición, los ratones, previamente anestesiados con isoflurano, fueron inoculados por vía in con la cepa invasiva 1722<sup>16F</sup>R4 y la cepa tipo EPOC 1722<sup>16F</sup>R4HT. Se determinaron diariamente los niveles bacterianos en sangre a lo largo de una semana y se anotaron los registros de muerte y supervivencia. Los animales que sobrevivieron al cabo de 7 días tras la infección, fueron sacrificados para determinar los recuentos bacterianos en BALF, pulmón y sangre.

Se observó un 60% de supervivencia en los animales infectados con la cepa tipo EPOC 1722<sup>16F</sup>R4HT mientras que, en el grupo de ratones infectados con la cepa invasiva 1722<sup>16F</sup>R4, tan sólo sobrevivieron un 30% de los mismos (Fig. 46A). Además, se encontraron niveles elevados de bacteria tanto en BALF como en los pulmones de los animales infectados con ambos tipos de cepas, confirmando que la exposición al HT favorece la colonización del tracto respiratorio por parte de neumococo (Fig. 46B).

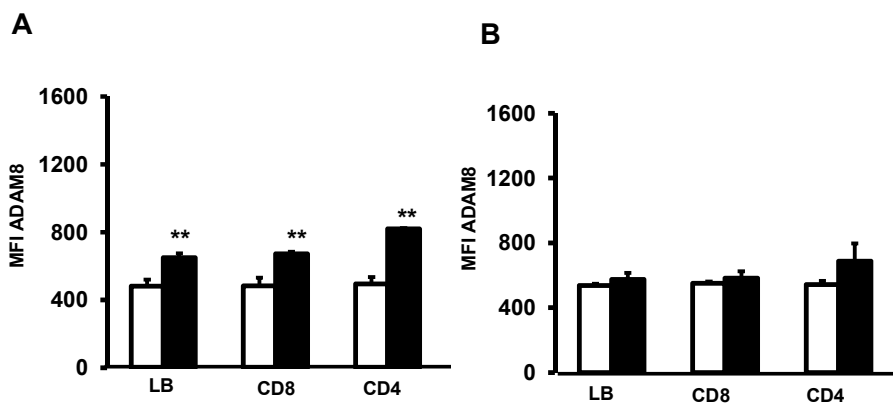


**Fig. 46. Modelo murino de neumonía neumocócica causado por las cepas 1722<sup>16F</sup>R4 y 1722<sup>16F</sup>R4HT tras ser expuestos durante 3 semanas a EHT puro.** (A) Niveles de supervivencia en ratones CD1 durante 7 días tras la infección con la cepa invasiva pasada por ratón 1722<sup>16F</sup>R4 (línea negra) o con la cepa tipo EPOC 1722<sup>16F</sup>R4HT (línea roja discontinua). (B) Recuento bacteriano en BALF, pulmón y sangre de ratones infectados que sobrevivieron a los 7 días de seguimiento. Las barras de error representan la DS.

#### 4.2.2. Impacto de la exposición al HT sobre la expresión y funcionalidad de PSGL-1 en ratones

Como ya se ha comentado, PSGL-1 tiene un papel protector muy importante frente a la ENI, ya que está involucrado, principalmente, en el reconocimiento y eliminación de neumococo en el torrente circulatorio (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que los resultados derivados de esta Tesis Doctoral demostraban que la exposición al HT disminuye la expresión de PSGL-1 en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos, se decidió analizar el efecto del HT en la expresión y funcionalidad de este receptor a nivel *in vivo*. Para ello, se utilizaron grupos de ratones silvestres C57BL/6 y ratones deficientes en PSGL-1 que fueron expuestos a EHT puro durante 2 semanas por vía *in*, administrando una dosis diaria. Pasado este tiempo, los animales fueron sacrificados y se analizó la proporción de neutrófilos y linfocitos B y T en los pulmones de ambos grupos, ratones silvestres y ratones deficientes en PSGL-1, comparando los resultados con ratones silvestres y carentes de PSGL-1 pero no expuestos a HT. Además, se midió la expresión del receptor en los ratones silvestres y de su regulador, la metaloproteasa ADAM8 (Dominguez-Luis *et al.*, 2011). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones celulares estudiadas entre los grupos de ratones tras la exposición al HT (datos no mostrados).

El siguiente objetivo consistió en caracterizar las poblaciones celulares de neutrófilos, linfocitos B y T y células dendríticas, así como la expresión de PSGL-1 y ADAM8 en dichas poblaciones a nivel de sangre periférica, tanto en ratones silvestres como en deficientes en PSGL-1 expuestos o no al EHT durante 2 semanas. No se observaron diferencias significativas en ninguna de estas poblaciones celulares ni tampoco en los niveles de PSGL-1 expresados por las mismas (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se analizó la expresión de ADAM8 en la superficie de las diferentes poblaciones celulares analizadas, sí que se observó un aumento significativo en los niveles de ADAM8 expresados en las células de los ratones silvestres (Fig. 47A) pero no en las células de los ratones deficientes en PSGL-1 (Fig. 47B). Estos resultados sugieren que la exposición al HT incrementa la expresión de ADAM8 en células linfoides, lo que podría ser relevante desde el punto de vista de la infección, ya que ADAM8 está involucrado en la inactivación de PSGL-1 en la superficie celular.



**Fig. 47. Niveles de expresión de ADAM8 en ratones silvestres y ratones deficientes en PSGL-1 expuestos o no a EHT.** (A) Expresión de ADAM8 en linfocitos B (LB), CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> de ratones silvestres. Las barras en blanco representan a los ratones no expuestos a EHT mientras que las barras en negro representan a los ratones expuestos a EHT. (B) Expresión de ADAM8 en linfocitos B, CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> de ratones deficientes en PSGL-1. Las barras blancas representan a los ratones no expuestos a EHT mientras que las negras representan a los ratones expuestos a EHT. Los resultados se expresan como intensidad media de fluorescencia (MFI). Las barras de error representan la DS y los asteriscos indican los valores estadísticamente significativos (test *t* de Student de 2 colas; \*\*,  $P < 0.01$ ).

## 5. ESTUDIO DEL IMPACTO GENÓMICO DEL HT

La exposición continuada de *S. pneumoniae* a un agente mutagénico como es el HT es previsible que origine cambios genéticos. Teniendo en cuenta que la EPOC está altamente asociada al tabaquismo (Rabe *et al.*, 2007; Zalacain *et al.*, 1999), se planteó que los cambios originados por el consumo de tabaco podrían modificar el patrón de infección del microorganismo favoreciendo el desarrollo de un fenotipo de cronicidad o persistencia de la bacteria en el pulmón de los pacientes con EPOC. Esta hipótesis está sustentada en dos hechos: 1) que se observara que en los aislados de ENI la exposición a 1% de EHT durante cultivos sucesivos (aislados tipo EPOC), permitía a la bacteria comportarse como un aislado procedente de pacientes con EPOC, es decir, que la exposición a EHT reducía el contenido de PCho de la superficie bacteriana de éstos y 2) que este fenotipo no se revirtiera cuando las cepas tipo EPOC se multiplicaron el mismo número de pases sucesivos sin EHT en el medio de cultivo. Esto es, el HT parecía estar produciendo cambios genéticos que podrían ser responsables, al menos en parte, de la persistencia pulmonar de neumococo en estos pacientes. Por ello, el siguiente objetivo de la Tesis Doctoral consistió en analizar el genoma completo de los diferentes aislados clínicos de neumococo con el fin de evaluar el impacto de la exposición al HT en algunos de los genes implicados en la patogénesis del microorganismo. Se secuenciaron y analizaron los genomas completos de 5 aislados procedentes de pacientes con EPOC, ENI y aislados tipo EPOC de los serotipos 11A y 16F de *S. pneumoniae* (n = 30). Además, en este estudio, se incluyeron 50 aislados clínicos recogidos por el Servicio de Microbiología del Hospital Universitari de Bellvitge (Barcelona) obtenidos de los esputos de pacientes con EAEPOC, representando así un espectro más amplio de los serotipos de neumococo más frecuentemente aislados en estos pacientes. Estos aislados se incluyeron con la finalidad de buscar cambios genéticos comunes al fenotipo crónico y poder así determinar, en un contexto más amplio, los posibles genes de neumococo responsables de este fenotipo persistente. La secuenciación de todos estos genomas se realizó en colaboración con el Prof. Stephen Bentley del *Wellcome Trust Sanger Institute* (Inglaterra).

### 5.1. Estudio filogenético de los aislados de neumococo expuestos o no a EHT

Con el objetivo de comprobar las relaciones esperadas entre los aislados estudiados, expuestos o no a EHT, se realizó un alineamiento múltiple de todas las secuencias y se construyó un árbol filogenético de los aislados procedentes de pacientes con EPOC, ENI y las cepas tipo EPOC usando como referencia la cepa ATCC 700669 de serotipo 23F. A la vista del filograma (disponible en <https://microreact.org/project/ByBTLAR4>) se pudo comprobar que los pares de aislados (aislado ENI y su respectiva cepa tipo EPOC) se encontraban muy próximos, a excepción de una pareja de aislados (1953\_2#67, aislado de ENI y su correspondiente aislado tipo EPOC, 1953#77). Se comprobaron los serotipos y secuencitipos de todos los aislados con las herramientas bioinformáticas SEROTYPER.SH y GETMLST.PY. Esto permitió identificar que la pareja de aislados que aparecían separados en la filogenia no estaban en realidad relacionados, por lo que fueron eliminados del estudio. Los datos de fecha de aislamiento, serotipo y secuencitipo de los aislados está disponible en el árbol filogenético *online*. A partir del filograma también se pudo observar que casi todos los serotipos se encontraban agrupados en el mismo clado a excepción de los aislados de serotipos 11A, 6C o 19F.

## 5.2. Análisis del genoma completo de los aislados procedentes de EPOC, ENI y cepas tipo EPOC

En primer lugar, se abordó el estudio de manera comparativa analizando la secuencia de DNA entre los pares de aislados expuestos o no a EHT, empleando como genoma de referencia la cepa no tratada procedente de ENI de cada paciente. El estudio de SNPs e INDELS mediante las herramientas BWA y CORTEX mostró que la exposición a EHT inducía mutaciones en todos los aislados a lo largo del genoma, las cuales, en ocasiones, originaban cambio del aminoácido correspondiente pero, sin embargo, no reveló mutaciones compartidas entre los diferentes aislados expuestos a EHT. Se estudió la existencia de funciones comunes entre los genes alterados mediante el estudio de rutas génicas compartidas con las plataformas Blast2go y KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Du *et al.*, 2014).

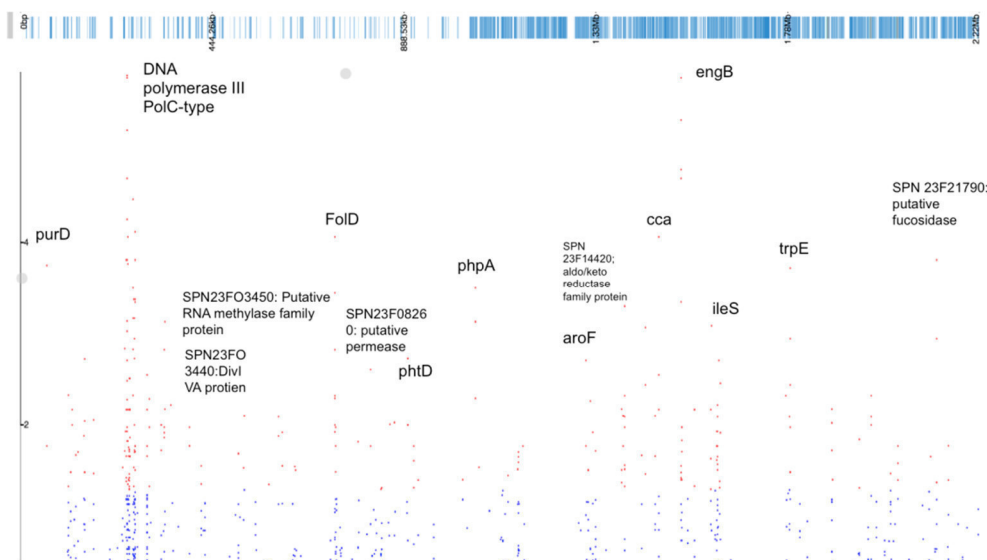
Los resultados analizados hasta la fecha no son concluyentes; no se observó que alguna ruta estuviera claramente afectada, ni que pudiera estar vinculada con el fenotipo crónico en comparación al fenotipo invasivo (datos no mostrados). Sin embargo, sí se observaron cambios comunes en varios aislados que afectaban a funciones genéricas que incluían procesos de unión de iones y oxidorreductasas, así como rutas relacionadas con el procesamiento de la información genética, ambiental y el metabolismo de carbohidratos (datos no mostrados). Para el análisis de estos resultados es necesario un estudio más detenido que requeriría un periodo de tiempo no disponible en esta Tesis.

Sobre la base de la ausencia de mutaciones genéticas comunes y teniendo en cuenta que el mapeo eficiente de dos genomas reside en la presencia de genes en la secuencia empleada como referencia, se estudió la presencia o ausencia de genes en las cepas tipo EPOC en comparación con los aislados de pacientes con ENI utilizando la herramienta informática ROARY (Page *et al.*, 2015). Dicho de otra manera, se comprobó si existían genes *core* en los aislados de pacientes con ENI que no estuviesen intactos tras la exposición a EHT en las cepas tipo EPOC. ROARY permite determinar el total de genes, del *core* y accesorios, presentes en un grupo de genomas empleando los ensamblajes anotados. Este análisis reveló un tamaño del pangenoma y del *core* de 2901 y 1572 secuencias codificantes (CDS), respectivamente, y se hallaron 187 genes con diferencias entre los aislados de pacientes con ENI y las cepas tipo EPOC. Estos 187 genes dieron lugar a 31 funciones comunes interrumpidas cuando se redujeron a una lista de funciones únicas (datos no mostrados). Sin embargo, no se observó un patrón consistente que implicase la presencia o ausencia de genes del *core* de manera común en un grupo de aislados y que, por tanto, pudiese explicar el fenotipo persistente observado en los aislados procedentes de pacientes con EPOC o cepas tipo EPOC. La mayor tasa de diferencias estaban ligadas a elementos genéticos móviles, los cuales, a pesar de jugar un papel crítico en la difusión de factores de virulencia, no son lo suficientemente estables para asumir que sean responsables de las diferencias fenotípicas observadas.

## 5.3. Marcadores poblacionales

La comparación de la secuencia de DNA entre los pares de aislados expuestos o no a EHT no mostró ninguna mutación compartida entre las cepas expuestas a EHT. Debido a la ausencia de

genomas completos secuenciados para todos los serotipos y STs del estudio para usar como referencia, el siguiente abordaje de este estudio consistió en estudiar todos los aislados secuenciados frente al genoma completo y anotado de la cepa de *S. pneumoniae* ATCC 700669. En este análisis se incluyeron aislados con el mismo fondo genético, procedentes de pacientes con ENI o de portadores sanos recogidos en el Laboratorio de Referencia de Neumococo de Southampton (Inglaterra) con el objetivo de encontrar posibles cambios comunes en los aislados procedentes de pacientes con EPOC no presentes en los diferentes fondos genéticos y serotipos de aislados invasivos. El estudio de asociación del genoma completo (GWA, del inglés *Genome Wide Association*) a partir de los SNPs generados, empleando un valor *p*-Fisher ajustado de  $2 \times 5$  para cada posición, reveló varios genes que fueron identificados como candidatos para futuros estudios (Fig. 48).



**Fig. 48. Gráfico de Manhattan generado a partir del estudio GWA.** Las muestras incluidas proceden de aislados de pacientes con EPOC de España y aislados de ENI de Inglaterra. El gráfico ha sido generado mediante la herramienta PHANDANGO.

Para evitar errores estadísticos, se intentó controlar la estructura de la población utilizando muestras obtenidas de pacientes con EPOC, elegidas aleatoriamente, para ser emparejadas individualmente para cada genotipo estudiado con aislados obtenidos de pacientes con ENI o de portadores sanos. El gráfico de Manhattan resultante no mostró el agrupamiento horizontal típico de valores *P* que están asociados a estructuras poblaciones no controladas. Sin embargo, en el gráfico Q-Q (Fig. 49) obtenido a partir de las muestras empleadas, sí se observó la existencia de un incremento muy marcado de los valores *P* por encima de lo esperado. Este incremento indica que existen diferencias inherentes desconocidas y que no se pudieron controlar, entre los aislados procedentes de EPOC y los aislados procedentes de ENI o de aislados de portadores sanos empleadas como control. Teniendo en cuenta lo anterior, cualquier hallazgo de interés en este análisis es susceptible de corresponder a un falso positivo. Por ello, los posibles genes candidatos a estar alterados por el efecto del HT podrían tenerse en cuenta para futuros análisis, siempre y cuando fueran contrastados con análisis alternativos que permitan comprobar el efecto

de HT sobre los mismos, así como la implicación de estos genes en el proceso biológico y patogénesis de neumococo en la EPOC.

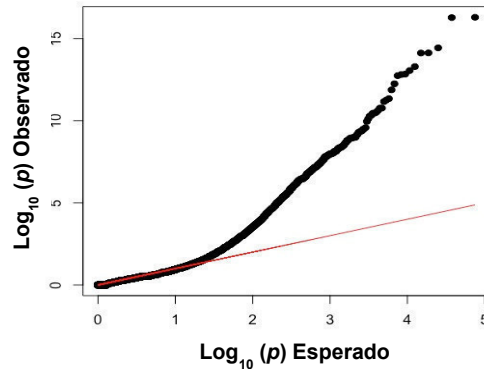


Fig.49 . Gráfico Q-Q para la determinación de la inflación del valor  $P$ .

#### 5.4. Estudio poblacional de aislados de pacientes con EPOC

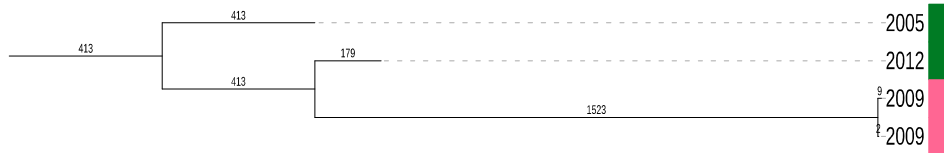
La siguiente tarea consistió en construir un árbol filogenético de todos los aislados descritos en esta Tesis Doctoral, procedentes de los pacientes con EPOC junto con los aislados responsables de ENI o de portadores sanos, obtenidos de pacientes de Southampton, con el fin de realizar un análisis comparativo de la distribución y evolución de estos aislados.

El filograma (disponible en <https://microreact.org/project/HJNGagaD>) sugirió que las cepas de pacientes con EPOC se distribuyen ampliamente en la especie. Además, se localizaron grupos de aislados crónicos pertenecientes a un serotipo y ST en múltiples localizaciones del árbol, existiendo algunos ST estrechamente agrupados. Debido a esta estrecha (e inesperada) relación entre algunos aislados obtenidos de pacientes con EPOC, se estudió en mayor profundidad aquellos aislados más próximos, empleando, como referencia, aislados invasivos procedentes de Southampton, en principio alejados filogenéticamente.

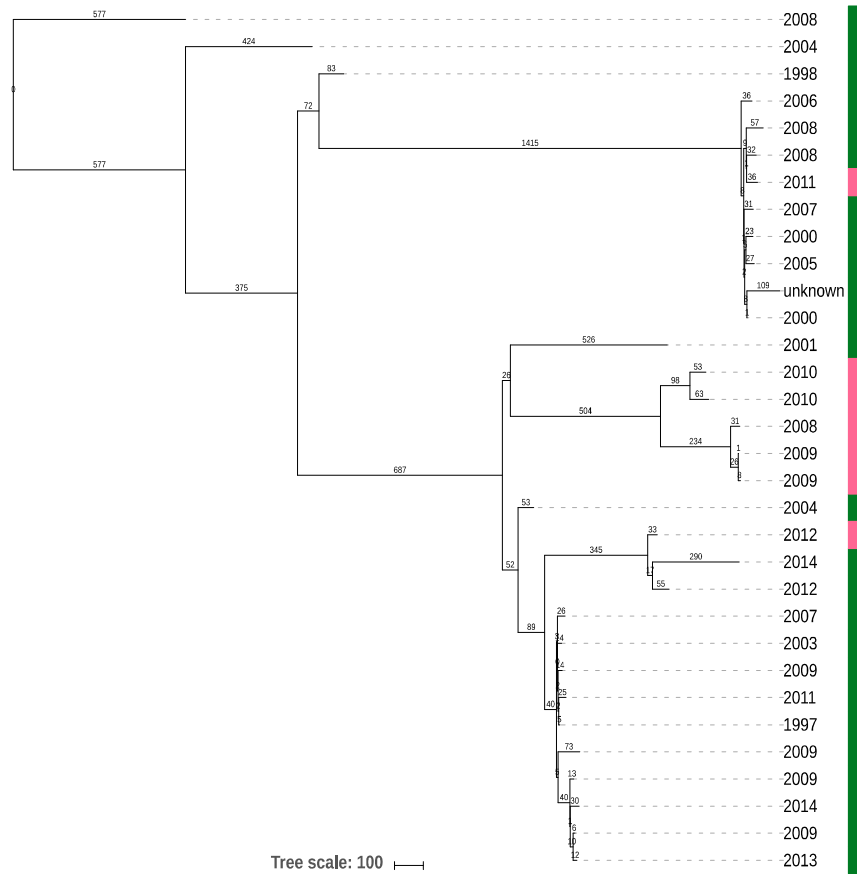
Los resultados mostraron que el ST6521<sup>11A</sup> (Fig. 50A) incluye aislados con muy poca distancia de SNPs entre ellos (distancia aproximada de 10 SNPs) sugiriendo una posible transmisión entre la población con EPOC. Además, también mostró evidencias de clones circulantes localmente entre las poblaciones de EPOC en uno de los pares de aislados estudiados de ST433<sup>22F</sup> (Fig. 50B), debido a la existencia de un ancestro común muy cercano y la reducida distancia en SNPs, ( $n = 57$ ). En el resto de clones (Figs. 50 C y D) no se observó cercanía en términos de distancia entre los aislados EPOC, aunque cabe destacar que en el ST717<sup>33</sup> existen un par de aislados con una distancia reducida en SNPs ( $n = 43$ ), teniendo en cuenta los años en los que fueron aisladas tales cepas. Es importante matizar que en cada proceso de recombinación se pueden introducir un gran número de SNPs, de modo que si se descuenta la tasa de recombinación, la distancia en SNPs observada entre los aislados podría disminuir considerablemente. Sin embargo, sería necesario incluir más datos epidemiológicos para poder comprender la dinámica,

a nivel local, de los diferentes secuencitipos de neumococo en la población procedente de pacientes con EPOC.

**A** Tree scale: 100

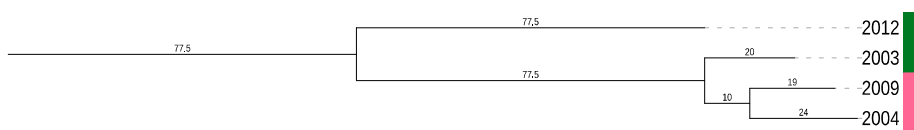


**B**

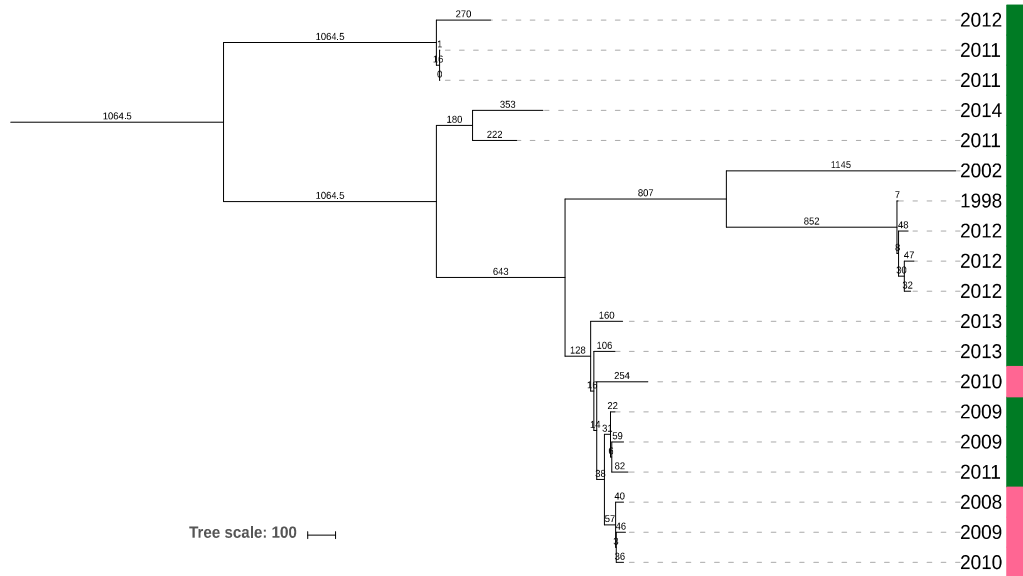


**C**

Tree scale: 100



**D**



**Fig. 50. Estimación por máxima verosimilitud del árbol filogenético de los grupos observados en <https://microreact.org/project/HJNGagaD>.** Los árboles se han construido sobre la base de los SNPs generados del alineamiento genómico múltiple de cada secuencitipo estudiado de EPOC (barras rosas) frente a cepas responsables de ENI (barras verdes), usadas como referencia y procedentes de la colección de muestras de Southampton. Los valores indicados se obtuvieron mediante la herramienta iTOL (A) ST6521<sup>11A</sup>; (B) ST433<sup>22F</sup>; (C) ST717<sup>33</sup>; (D) ST97<sup>10A</sup>.

### 5.5. Estudio de genes de neumococo relacionados con la modulación del contenido en PCho

Como ya se ha comentado, los estudios *in vitro* de esta Tesis Doctoral demuestran que los aislados procedentes de pacientes con EPOC presentan una mayor capacidad para evadir la inmunidad mediada por el complemento mediante la reducción de su contenido en PCho, en comparación con los aislados de ENI. Este fenotipo fue confirmado cuando los aislados procedentes de ENI se expusieron durante cultivos seriados a 1% de EHT. La localización de los genes y el alineamiento múltiple del genoma completo de los aislados procedentes de pacientes con EPOC o cepas tipo EPOC frente al genoma de la cepa de referencia ATCC 700669, no reveló ningún SNP común en los aislados, de la misma manera que tampoco el análisis mediante ROARY permitió detectar ausencia de genes esenciales. Sin embargo, los resultados previos de nuestro laboratorio, empleando mutantes isogénicos y estudiando la curva de crecimiento (y lisis), sugerían que los aislados de pacientes con EPOC presentan una mayor actividad de las proteínas Pce y LytA. Esto ocasionaría la reducción observada del contenido de PCho permitiendo, de esta manera, el menor reconocimiento por el sistema del complemento y

contribuyendo así al fenotipo de persistencia y cronicidad de neumococo en los pulmones de pacientes con EPOC. Sobre la base de estos resultados y para comprobar esta hipótesis, se analizaron con más detalle las secuencias concretas de los genes *lytA* y *pce* de los 80 aislados secuenciados. Para ello, se extrajo la secuencia correspondiente a cada gen mediante PCR *in silico* y se llevó a cabo un alineamiento múltiple de las mismas.

#### 5.5.1. Análisis genómico de *pce*

Como ya se comentó en la introducción de esta Memoria, la Pce presenta una gran afinidad por la colina y, con especial relevancia para este estudio, cataliza la hidrólisis de alrededor del 20–30% del total de los residuos de PCho presentes en WTA y LTA (de las Rivas *et al.*, 2001; Lagartera *et al.*, 2005). Pce contiene la organización típica de una CBP. El gen codifica para una pre-proteína con un extremo N-terminal que contiene un péptido señal de 25 aminoácidos (aa) de longitud, el cual, tras ser escindido, da lugar a una proteína madura que es secretada a la pared celular. De manera destacable, contiene una larga cola de 85 aa en el extremo carboxilo terminal (de las Rivas *et al.*, 2001). El análisis detallado de la secuencia de *pce* de los 80 aislados estudiados ha mostrado la existencia de 21 alelos diferentes y la alineación de la secuencia de aa deducida de los mismos, ha permitido la identificación de 18 alelos de Pce diferentes (Tabla 10). De manera inesperada, se encontró que en 3 alelos *pce* los genes codificaban una proteína truncada y, por tanto, seguramente no funcional. Además, estos alelos estaban presentes en 7 aislados obtenidos de pacientes con EPOC. El gen *pce* de R6, que se ha empleado como control en este análisis, codifica una proteína de 627 aminoácidos (69426 Da), incluyendo el péptido señal. Hay que resaltar el hecho de que, hasta la fecha, no era conocido el elevado polimorfismo de esta proteína ni, por tanto, la actividad enzimática de los distintos alelos descubiertos. Con el fin de encontrar una relación entre las diferentes mutaciones que presentaban las secuencias estudiadas, se buscaron aa de importancia relevante formando parte del sitio activo de la proteína, el cual ha sido previamente descrito (Garau *et al.*, 2005) (código PDB: 1WRA), para predecir si podrían dar lugar a un cambio de la actividad de ésta. El sitio activo de esta metalofosfodiesterasa, situado en el módulo catalítico (extremo amino terminal), contiene un doble núcleo de zinc ( $Zn^{2+}$ ); estos átomos se encuentran firmemente unidos a la proteína, estabilizando este dominio a través de la coordinación de una compleja red de ligandos metálicos que resultan esenciales para la catálisis (Hermoso *et al.*, 2005; Lagartera *et al.*, 2005). Los iones de  $Zn^{2+}$  (llamados Zn1 y Zn2) se coordinan a través de su unión a diferentes aa. Zn1 se coordina por la unión a His85, His87 y Asn83 mientras que Zn2 interacciona con Asp89, His90 y His229). Merece especial atención el residuo His90, cuya mutación por Ala se ha demostrado que da lugar a una drástica reducción de la actividad de la proteína. Además, Pce también contiene iones  $Ca^{2+}$  (dos iones coordinados) que tienen un papel importante en la unión a la PCho. Ca1 se une a Glu36 y Asp37, mientras que Ca2 se coordina por unión a Gly92, Asp95 y Glu96 (de las Rivas *et al.*, 2001; Lagartera *et al.*, 2005). Por lo tanto, se estudiaron los diferentes residuos de Pce que intervienen en la unión al  $Zn^{2+}$  o al  $Ca^{2+}$ . Sin embargo, este análisis reveló que los residuos importantes para la catálisis se encontraban conservados en los diferentes aislados EPOC, ENI y cepas tipo EPOC (Anexo I). Cabe destacar que en uno de los alelos, concretamente en el alelo 13, se observó la delección de una CBR en el CBD.

**Tabla 10.** Correspondencia entre los alelos *pce* y *Pce* de *S. pneumoniae*.

Nº de aislado <sup>a</sup> (19536_2#)	Alelo <i>pce</i>	Alelo <i>Pce</i>	Nº. Acceso
R6	1	1	WP_000728289.1
20, 24, 33, 39	2	2	WP_000728269.1
21	3	3	WP_000728276.1
7, 11, 15	4	4	WP_061741598.1
3, 10, 16, 19, 22, 26, 30, 43, 48	5	5	WP_000728261.1
14, 34, 37, 41, 46	6	6	WP_000728255.1
8, 17, 18, 25, 31, 44	7	7	WP_054363449.1
1	8	8	WP_000728272.1
5, 23, 27, 29	9	9	WP_000728287.1
4, 28, 36, 38, 42, 50	10	10	WP_000728288.1
2, 35	11	11	WP_044789102.1
45	12	12	–
51, 52, 68, 78	13	13	WP_000728249.1
53, 67	14	14	WP_000728250.1
54, 55, 66, 69, 70, 76, 79, 80	15	15	WP_000728291.1
56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65,	16	16	WP_002206730.1
71, 72, 73, 74, 75			
6	17	17	WP_061365506.1
49	18	18	WP_000728257.1
12, 32, 47	19	Truncado	
13, 40	20	Truncado	
9, 57	21	Truncado	

<sup>a</sup> Aislados procedentes de ENI (color fucsia), tipo EPOC (color azul claro) o procedentes de EPOC (no resaltados). La cepa R6 (AE008540) se ha empleado como referencia.

### 5.5.2. Análisis genómico de *lytA*

La principal autolisina de neumococo ha sido ampliamente estudiada y se sabe que, además de intervenir en diversos fenómenos fisiológicos importantes, es uno de los principales factores de virulencia de la bacteria (Martner *et al.*, 2008; Martner *et al.*, 2009; Moreillon y Majcherczyk, 2003; Ramos-Sevillano *et al.*, 2016; Tuomanen, 2000) (para más detalle véase apartado 1.8.2 de la Introducción) y que, en relación a nuestro estudio, participa indirectamente en la modulación del contenido de PCho de la pared celular bacteriana (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). El gen *lytA* se localiza inmediatamente en posición 3' del clúster de genes *lytR–cinA–recA–dinF* (Mortier-Barriere *et al.*, 1998) en el genoma de *S. pneumoniae*, el cual se encuentra altamente conservado. Se sabe con exactitud que el gen está compuesto por 957 nt. Se ha descrito la existencia de numerosos alelos *lytA* de *S. pneumoniae* los cuales pueden clasificarse en dos familias denominadas Fam\_A y Fam\_B, atendiendo a la secuencia situada entre las posiciones 441 y 465 del gen. Esto se debe a que, aunque existen dos zonas del gen con una gran concentración de variabilidad (alrededor de los nt 767 y 923), la región con mayor grado de polimorfismo, y sobre cuya base se establecen las dos familias antes mencionadas, se sitúa alrededor del nt 453, hacia la mitad del gen. Sin embargo, este polimorfismo no supone ningún cambio en la secuencia proteica (Morales *et al.*, 2010).

Del análisis de la secuencia de *lytA* de 77 de los 80 aislados estudiados (en 3 casos no fue posible la obtención de la secuencia completa del gen) se encontraron 14 alelos diferentes (Tabla 11). La secuencia de aminoácidos deducida a partir de ellos fue alineada, dando lugar a la identificación de 3 NAM-amidasas diferentes. Los alelos de *lytA* se clasificaron sobre la base de las dos familias propuestas anteriormente; además, se compararon sus secuencias con los alelos

y las actividades enzimáticas de los mismo descritos por Morales y cols. (2015) (Tabla 11). Cabe destacar que los alelos LytA<sub>2</sub> y LytA<sub>5</sub> juntos representaron más del 98% (76 de 77) de las NAM-amidasas codificadas por los aislados de neumococo estudiados. Sin embargo, no se encontró asociación alguna entre los alelos *lytA* de los aislados EPOC y tipo EPOC con una mayor actividad de la autolisina LytA en comparación con los aislados procedentes de ENI. Por lo tanto, basándonos en la actividad enzimática específica descrita previamente para los alelos LytA, la actividad autolítica de la proteína no parece aumentar en los aislados tipo EPOC en comparación a sus cepas silvestres ENI, es decir, cuando los aislados procedentes de pacientes con ENI y las cepas tipo EPOC presentaban el mismo alelo protéico. Dado que se conoce bien la secuencia del promotor de *lytA* (Díaz y García, 1990), se estudió la existencia de posibles mutaciones que afectasen al mismo y, por tanto, a la actividad enzimática de la proteína, pero no se encontraron cambios en ninguno de los aislados estudiados (datos no mostrados).

**Tabla 11.** Correspondencia entre los alelos *lytA* y LytA de *S. pneumoniae*.

Nº aislado (19536_2#) <sup>a</sup>	Fam_ <sup>b</sup>	Alelo <i>lytA</i> <sup>c</sup>	Alelo LytA (°)	Actividad específica (HU/ mg <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup>
10, 19, 26	A	14	WP_000405234 (2)	$1.3 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
7, 11, 15	B	15	WP_000405240 (5)	$1.6 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$
12, 24, 32, 54, 55, 56, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 79, 80	B	10	WP_000405234 (2)	$1.3 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
13, 40	A	27 <sup>e</sup>	WP_000405234 (2)	$1.3 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
1, 14, 34, 37, 41, 45, 46	B	13	WP_000405234 (2)	$1.3 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
3, 16, 30, 43	B	8	WP_000405240 (5)	$1.6 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$
8, 17, 18, 25, 31, 33, 44	B	5	WP_000405240 (5)	$1.6 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$
20	B	28	WP_000405234 (2)	$1.3 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
9, 6, 21, 49, 51, 52, 53, 5, 68, 78	A	7	WP_000405240 (5)	$1.6 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$
22, 48	A	12	WP_000405234 (2)	$1.3 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
4, 23, 27, 29, 36, 38, 42, 50	A	2	WP_000405234 (2)	$1.3 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
2, 35	A	29	WP_000405234 (2)	$1.3 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
47	B	30	WP_000405234 (2)	$1.3 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^5$
67	B	11	WP_000405241 (7)**	$1.9 \times 10^6 \pm 2.1 \times 10^5$

<sup>a</sup> Aislados procedentes de ENI (color fucsia), aislados tipo EPOC (color azul) y aislados procedentes de EPOC (no resaltados).

<sup>b</sup> Fam\_A y Fam\_B de los alelos *lytA* se ha descrito previamente en Morales *et al.* (2010).

<sup>c</sup> Los genes y proteínas se han nombrado como en Morales *et al.* (2010).

<sup>d</sup> La actividad específica de alelos LytA se ha descrito previamente en Morales *et al.* (2015).

<sup>e</sup> Los nuevos alelos *lytA* y LytA se encuentran sombreados en fondo gris y negro, respectivamente.

## 5.6. Estudio de genes importantes en la patogénesis de *S. pneumoniae*

### 5.6.1. Análisis genómico de *ply*

La neumolisina es, junto con *LytA*, uno de los factores de virulencia más importantes de neumococo. Es una proteína que pertenece a una amplia familia de citolisinas dependientes de colesterol (Jedrzejewski, 2001) que, como ya se ha comentado en la Introducción de esta Memoria, induce la muerte y apoptosis celular mediante la formación de poros. Se ha propuesto, recientemente, que *ply*-*lytA* forman parte de una isla de patogenicidad donde, debido a la tendencia de ambos genes de permanecer cercanos en el genoma de *S. pneumoniae*, sus correspondientes productos génicos funcionen conjuntamente formando una red de proteínas patofisiológicas (Morales *et al.*, 2015). Se ha visto que, en condiciones *in vitro*, ambos genes son necesarios para la formación de un buen biofilm (Moscoso *et al.*, 2006; Shak *et al.*, 2013), así como se ha demostrado en modelos murinos de infección que la actividad coordinada de ambas proteínas es importante en la evasión del sistema inmune y en el establecimiento y sepsis de la neumonía neumocócica (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). Sobre la base de la relación existente entre *lytA* y *ply*, el estudio detallado de genes posiblemente afectados por la exposición a HT e implicados, de alguna manera, en la persistencia pulmonar observada en ciertos aislados de *S. pneumoniae* se extendió al gen *ply*, a pesar de que no está relacionado con el metabolismo de la PCho.

El gen *ply* (1416 bp) está relativamente bien conservado entre los aislados de neumococo (Marriott *et al.*, 2008) aunque se han descrito alelos Ply con actividad hemolítica reducida o sin actividad (Jefferies *et al.*, 2007; Kirkham *et al.*, 2006). Cabe destacar la existencia de un gen homólogo a *ply* que está presente en cepas no capsuladas de *S. pneumoniae* y que ha sido denominado por algunos autores *plyB*, para diferenciarlo de *ply*. Esto se debe a que comparte la misma longitud y el 98% de los nt del gen *ply*, pero se encuentra lejos de éste en el cromosoma formando parte de elementos integrativos (Morales *et al.*, 2015). De manera similar a lo descrito para *lytA* se ha propuesto la subdivisión de los alelos *ply* en 2 familias: Fam\_1 cuando los alelos mantienen toda la longitud del gen (1416 bp) y Fam\_2 cuando carece de los nt localizados en las posiciones 808 y 813 que codifican Val270 y Lys271 y, por tanto, los alelos poseen 1410 bp (Morales *et al.*, 2015). Estudios previos han asignado números (del 1 al 20) a los distintos alelos de Ply encontrados (Harvey *et al.*, 2011; Jefferies *et al.*, 2007; Jefferies *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2015), así como han determinado la actividad específica de algunos de ellos (Harvey *et al.*, 2011; Jefferies *et al.*, 2007; Jefferies *et al.*, 2010). En este estudio, se ha mantenido la nomenclatura asignada a los diferentes alelos en los casos que existía, y se ha continuado con la enumeración para los nuevos (Tabla 12). Hay que destacar que los 80 aislados estudiados mantienen la longitud completa del gen (Fam\_1) y que los alelos 1 y 2 representan el 80% de los aislados con una actividad alrededor de, aproximadamente,  $4 \times 10^5$  unidades hemolíticas (HU)  $\text{mg}^{-1}$ . Sin embargo, no se encontró diferencia entre el alelo Ply y la actividad descrita para cada alelo cuando se compararon los aislados EPOC y tipo EPOC con respecto los aislados ENI.

**Tabla 12.** Correspondencia entre los alelos *ply* y Ply de *S. pneumoniae*.

Nº cepa <sup>a</sup> (19536_2#)	Alelo <i>ply</i> (Fam_) <sup>b</sup>	Nº de acceso de <i>ply</i> en las bases de datos	Alel o Ply	Actividad específica (HU mg <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	Referencia
2, 35	1 (1)	AE005672	2	4.4 × 10 <sup>5</sup>	(Jefferies <i>et al.</i> , 2010)
20	2 (1)	GU968237	2		(Jefferies <i>et al.</i> , 2010)
9, 24, 49, 51, 52, 53, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 71, 72, 73, 74, 75, 78	3 (1)	GU968219	2		(Jefferies <i>et al.</i> , 2010)
3, 16, 30, 43	5 (1)	GU968217	2		(Jefferies <i>et al.</i> , 2010)
1	9 (1)	GU968385	2		(Jefferies <i>et al.</i> , 2010)
6, 21	10 (1)	GU968223	1	4.1 × 10 <sup>5</sup>	(Jefferies <i>et al.</i> , 2010)
7, 10, 11, 13, 15, 19, 26, 40	11 (1)	EF413947	1		(Jefferies <i>et al.</i> , 2007)
5, 23, 27, 29	13 (1)	CP002176	1		No publicado
33, 44	15 (1)	GU968247	1		(Jefferies <i>et al.</i> , 2010)
28, 36, 38, 42, 50	16 (1)	CP000920	1		–
37	18 (1)	CP000936	1		No publicado
54, 55, 66, 69, 70, 76, 79, 80	24 (1)	GU968397	9	3.1 × 10 <sup>5</sup>	(Jefferies <i>et al.</i> , 2010)
14, 34, 41, 45, 46	27 (1)	GU968238	2		(Jefferies <i>et al.</i> , 2010)
4	36 (1)	GU968266	1		–
12, 32, 47	37 (1)	LN847353	1		–
22, 48	38 (1)	–	2		–
8, 17, 18, 25, 31	39 (1)	NZ_FDOI01000008	22		–
39	40 (1)	NZ_CFDJ01000038	23		–
56, 77	41 (1)	–	21 <sup>e</sup>		–

<sup>a</sup> Aislados procedentes de ENI (color fucsia), aislados tipo EPOC (color azul) y aislados procedentes de EPOC (no resaltados).

<sup>b</sup> Las Fam\_1 y Fam\_2 de los alelos *ply* se han descrito previamente (Morales *et al.*, 2015).

<sup>c</sup> La actividad específica de los alelos Ply se ha descrito previamente (Jefferies *et al.*, 2007; Jefferies *et al.*, 2010).

<sup>e</sup> Los nuevos alelos *ply* y Ply se encuentran resaltados en fondo en gris y negro, respectivamente.



## **V. DISCUSIÓN**



## 1. EMERGENCIA DE AISLADOS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÁMICOS QUE EXPRESAN EL SEROTIPO 11A

*S. pneumoniae* es uno de los patógenos humanos más importantes, responsable de infecciones severas, tales como neumonía, meningitis y septicemia, asociadas con una alta mortalidad y morbilidad en todo el mundo (Kadioglu *et al.*, 2008; O'Brien y Levine, 2006; O'Brien *et al.*, 2009; van der Poll y Opal, 2009). La capsula polisacáridica es uno de los principales factores de virulencia de la bacteria y la gran diversidad de CPS existentes favorece la evasión tanto del reconocimiento por parte del sistema del complemento como de la fagocitosis (Hyams *et al.*, 2010). La expansión mundial de cepas pertenecientes a diferentes CCs ha proporcionado a *S. pneumoniae* una mayor capacidad para colonizar y causar enfermedad en la comunidad. Los diferentes CCs de neumococo consisten en aislados relacionados genéticamente que evolucionaron a partir de un clon común, es decir, de aislados que poseían el mismo ST. Mediante mutaciones y eventos de transferencia horizontal de genes, que implican tanto la recombinación homóloga como la no homóloga (Laible y Hakenbeck, 1987), los diferentes miembros de un clon, que en un principio eran indistinguibles por MLST, con el tiempo, pueden diversificarse dando lugar a variantes que difieren en uno de los siete *loci* (SLV) o más (Aanensen y Spratt, 2005). Algunos serotipos de neumococo presentan mayor diversidad genética que otros, lo cual es importante en términos de diseminación debido a que el cambio de genes capsulares por transformación permite a los aislados de ciertos genotipos de neumococo la posibilidad de expresar diferentes tipos capsulares. Como consecuencia de estos eventos y debido a que se ha descrito que los genes que codifican algunas PBP's están localizados flanqueando el locus capsular, *S. pneumoniae* ha sido capaz de desarrollar resistencia antibiótica (Laible y Hakenbeck, 1987; Laible *et al.*, 1991). Esto podría explicar por qué estas resistencias se observan, principalmente, en serotipos asociados a la colonización de la nasofaringe infantil. El hecho de que el tracto nasofaríngeo constituya un nicho ecológico habitado por varias especies de estreptococos, ha podido facilitar la posibilidad de transferencia interespecífica de DNA.

Las vacunas conjugadas existentes, como son la PCV7, PCV10 y PCV13, confieren protección frente a la ENI (Feikin *et al.*, 2013; O'Brien y Levine, 2006). Sin embargo, ya desde la introducción de la PCV7 se describió, en todo el mundo, la existencia de un reemplazo de serotipos, demostrando que es necesaria la incorporación de nuevos polisacáridos capsulares en las vacunas para mantener la protección frente a los nuevos tipos capsulares circulantes (Fenoll *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2012). Un ejemplo de esto fue la emergencia del clon multirresistente CC320 expresando el serotipo 19A, que se diseminó rápidamente por todo el mundo tras la implementación de la vacuna PCV7 causando ENI en niños y adultos. La introducción de dicho serotipo en la PCV13 ha originado una disminución de su frecuencia en la colonización de la población infantil (Tarragó *et al.*, 2011). De manera similar, esta Tesis Doctoral ha permitido identificar la emergencia de aislados causantes de ENI pertenecientes al serotipo 11A, principalmente en pacientes adultos, tras la implantación de las vacunas conjugadas en España (PCV10 y PCV13). La proporción de casos de enfermedad neumocócica no invasiva asociada al serotipo 11A también se vio incrementada en España entre los años 2000 y 2012, pasando de un 3.3% a un 9.3% en adultos ( $P < 0.001$ ) y de 0% a 10.8% en niños ( $P < 0.01$ ). Este hecho es

de gran importancia puesto que serotipos como el 11A, que no están incluidos en la vacuna conjugada PCV13 y que están asociados a un aumento de casos de enfermedad neumocócica post-PCV, podrían establecerse como uno de los más prevalentes en los próximos años.

La caracterización molecular de los aislados del serotipo 11A reveló la existencia de tres secuencitipos diferentes circulantes. El ST62<sup>11A</sup>, ampliamente conocido, susceptible a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, y dos nuevos secuencitipos emergentes resistentes a PEN y AMX, los ST6521<sup>11A</sup> y ST838<sup>11A</sup>. Estos dos últimos secuencitipos, resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, aparecieron a partir del año 2005 debido, posiblemente, a la presión inmunológica de las vacunas conjugadas y han aumentando drásticamente a partir del 2010. Durante esta Tesis Doctoral, hemos podido comprobar que son variantes del clon Spain<sup>9V</sup>-ST156, que fue uno de los más extendidos en todo el mundo antes de la introducción de la vacuna PCV7 y que se caracteriza por su reducida susceptibilidad a la penicilina y su gran capacidad para causar ENI (Hanage *et al.*, 2005; Henriques-Normark *et al.*, 2008; Porat *et al.*, 2004; Sjostrom *et al.*, 2007). Previamente, en Israel, se habían descrito variantes del ST156 expresando el serotipo 11A (Porat *et al.*, 2004). Sin embargo, en España, desde 1980, los aislados de este secuencitipo siempre se habían asociado con los serotipos 9V y 14, ambos incluidos en la vacuna actual PCV, los cuales causaron la mayoría de los casos de ENI entre la población adulta (11.6%) (Ardanuy *et al.*, 2009). Por ello, la emergencia de cepas provenientes del linaje ST156, que expresan el serotipo 11A pero que no son susceptibles a penicilina, es de gran importancia, ya que podrían suponer un grave problema en el futuro debido a que: 1) la vacuna actual PCV13 no es eficaz frente a este tipo de aislados que están emergiendo y 2) la mayoría de ellos, siguiendo los criterios de CMI para enfermedades no meningéas, son resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos lo que impediría el uso de este antibiótico para el tratamiento de la enfermedad neumocócica en la comunidad.

Entre los nuevos secuencitipos del serotipo 11A, el ST838 asociado a PEN-R fue descrito a finales de 1990 expresando el serotipo 9V y colonizando las vías respiratorias en pacientes de EPOC (Gounder *et al.*, 2014; Stanhope *et al.*, 2008). Este ST parece ser el ancestro de la variante actual del serotipo 11A-ST838. A pesar de que se ha observado que los ST838<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> sólo difieren en dos nucleótidos de un *loci* del MLST (*aroE*), las diferencias demostradas en esta Tesis Doctoral en relación a su interacción con el sistema inmune humano sugieren la posible existencia de otras diferencias genómicas, consecuencia de eventos de recombinación del genoma de neumococo, como se ha descrito anteriormente (Golubchik *et al.*, 2012). Nuestros resultados sugieren que el ST838<sup>11A</sup> pudo servir como cepa intermediaria, pudiendo acumular cambios selectivos ventajosos en su conversión al ST6521<sup>11A</sup>.

La emergencia y propagación de aislados de neumococo con altos niveles de resistencia antibiótica podría, muy probablemente, afectar al tratamiento antibiótico, lo que implica la necesidad de comprender mejor la respuesta inmunitaria humana frente a un patógeno tan importante como *S. pneumoniae*. La enfermedad neumocócica, generalmente, tiene lugar cuando neumococo es capaz de migrar al tracto respiratorio inferior y a la circulación sistémica, causando ENI. Dependiendo de la localización puede causar neumonía bacteriémica adquirida en la comunidad, sepsis o, incluso, atravesar la barrera hematoencefálica y dar lugar a meningitis (Kadioglu *et al.*, 2008; Koedel *et al.*, 2002; McCullers y Tuomanen, 2001; van der Poll y Opal, 2009), que son patologías infecciosas muy graves, frecuentemente asociadas a la muerte del

paciente. Tanto la inmunidad innata como la adaptativa son factores fundamentales para la defensa del hospedador durante el desarrollo de la ENI, así como para la eliminación de neumococo del torrente sanguíneo, proceso que depende, de manera muy importante, de la opsonización del patógeno por componentes del complemento y su posterior fagocitosis (Kadioglu *et al.*, 2008; van der Poll y Opal, 2009). Por ello, la prevalencia de los diferentes serotipos de neumococo en la población depende de la capacidad de éstos para evadir la respuesta inmunitaria del hospedador.

El estudio de la interacción de los distintos secuencitipos con el sistema del complemento demostró que los aislados del ST62<sup>11A</sup> poseen una mayor capacidad para evadir la activación de la vía clásica que los aislados de los secuencitipos resistentes a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Los aislados del ST62<sup>11A</sup> mostraron una mayor capacidad para evadir el sistema inmune mediante la reducción de la opsonización por C1q y C3b y presentaron una capacidad aumentada para reclutar el regulador negativo de la CP, el componente C4BP. Este hecho tiene gran importancia, ya que la CP es la vía predominante de reconocimiento por el sistema del complemento y activación de la fagocitosis de neumococo (Brown *et al.*, 2002; Yuste *et al.*, 2008). Uno de principales factores de *S. pneumoniae* que está implicado en la captación de C4BP, así como en la degradación directa del C3b/iC3b depositado, permitiendo que los neumococos evadan de forma más eficaz la inmunidad del complemento y la fagocitosis, es la proteína LytA (Ramos-Sevillano *et al.*, 2015). En este sentido, el estudio detallado de la secuencia de LytA de los aislados de los diferentes secuencitipos del serotipo 11A de *S. pneumoniae* confirmó que las cepas del ST62<sup>11A</sup> presentaban una mutación causante del cambio His166-Tyr. Este cambio es importante desde el punto de vista funcional de la proteína, ya que se ha descrito que incrementa de forma significativa la actividad enzimática de LytA (Morales *et al.*, 2015), lo cual podría explicar por qué los aislados del ST62<sup>11A</sup> PEN-S son más resistentes a la inmunidad del complemento y la fagocitosis.

Entre los aislados PEN-R, el ST6521<sup>11A</sup> mostró un mecanismo similar al descrito para el ST62<sup>11A</sup>, presentando una mayor capacidad de reclutar el regulador negativo C4BP y una mayor eficacia evadiendo la inmunidad del complemento y la fagocitosis que la observada en los aislados del ST838<sup>11A</sup>. A pesar de que el número de aislados estudiados de cada ST es bajo, las diferencias observadas entre los diferentes aislados con su interacción con la CP podrían explicar el incremento de la incidencia del ST6521<sup>11A</sup> en la ENI en relación al ST838<sup>11A</sup>. Esta hipótesis concuerda con la relación existente entre la resistencia de la bacteria a la fagocitosis y su capacidad para mantenerse en estado de portador. Se ha descrito que los aislados más refractarios a ser eliminados por los neutrófilos poseen una mayor capacidad para persistir en la nasofaringe (Brueggemann *et al.*, 2007). En este sentido, los resultados obtenidos confirman este hecho, ya que los aislados del ST62<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> mostraron mayor resistencia, no solo a la inmunidad mediada por el complemento, sino también a la fagocitosis. Esta explicación inmunológica apoya los datos epidemiológicos, demostrando que las variaciones de ENI causadas por estos secuencitipos están ligadas a diferencias en la interacción con componentes esenciales de la respuesta inmune del hospedador.

En relación a la evolución bacteriana, los aislados que adquieren mutaciones que les confieren resistencia antibiótica poseen una ventaja selectiva para permanecer en la nasofaringe humana,

ya que reducen (o, incluso, anulan) los daños derivados del tratamiento antibiótico. Sin embargo, esta ventaja, generalmente, supone una disminución de otras capacidades de la bacteria, como pueden ser la velocidad de multiplicación, la invasividad o la capacidad de transmitirse con respecto a su cepa antecesora susceptible a los antibióticos (Schulz zur Wiesch *et al.*, 2010). No obstante, se ha descrito que este “coste biológico” que supone la adquisición de resistencia antibiótica puede ser aminorado por mutaciones secundarias compensatorias (Schulz zur Wiesch *et al.*, 2010). Además, el grupo de Tomasz y cols. (1988) estudiando la pared celular de neumococo de aislados PEN-S y PEN-R, observaron que los aislados de *S. pneumoniae* altamente PEN-R poseen diferente estructura del peptidoglicano. La adquisición de resistencia a PEN supone la remodelación de la actividad de las enzimas de la pared celular que, en ocasiones, alteran la interacción con los sustratos habituales durante la síntesis de la pared. De esta manera, los aislados PEN-R contienen más péptidos hidrofóbicos (puentes cruzados de dialanina o alanilserina) que los aislados PEN-S (García-Bustos *et al.*, 1988). En neumococos susceptibles tratados con PEN se ha visto que el muramil dipéptido, producto de degradación de la pared celular de las bacterias, sirve como un potente PAMP para el sistema inmune (Gust *et al.*, 2007). La disminución de este componente en los aislados PEN-R podría ser responsable de la reducida inmunogenicidad de éstos, lo cual podría proporcionar una ventaja alternativa a los aislados ST6521<sup>11A</sup> (frente a los del ST62<sup>11A</sup>) para establecerse en un futuro como el ST predominante entre los neumococos de serotipo 11A.

La formación de biofilmes, también, proporciona una ventaja a las bacterias durante la colonización de la nasofaringe y las etapas de adhesión, que son previas a la diseminación. Este mecanismo permite a las bacterias evadir la respuesta inmune y reducir su exposición a los antibióticos (Domenech *et al.*, 2013; Donlan y Costerton, 2002). Se ha descrito que la capacidad de los diferentes serotipos para formar biofilmes podría ser utilizada para predecir la expansión futura de serotipos no vacunales (Domenech *et al.*, 2014; Domenech *et al.*, 2015). Nuestros resultados muestran que los aislados invasivos del ST6521<sup>11A</sup> poseen mayor capacidad para formar biofilmes que los de los ST838<sup>11A</sup> y ST62<sup>11A</sup>. Este hecho ha podido contribuir a la emergencia de este secuencitipo durante los últimos años y, es posible, que el cambio de cápsula sea responsable de alguna de estas diferencias. Mención especial merece el hecho de que las diferencias en la expresión de la cápsula en las diferentes etapas de formación de los biofilmes pueden afectar al proceso. En relación a esto, cabe destacar que, bajo las condiciones empleadas para la serotipificación de los diferentes aislados, todos ellos presentaron cualitativamente la misma expresión capsular. Existen numerosos estudios que indican que hay más características, además de la expresión del CPS, que modulan la formación de biofilmes y la interacción con la inmunidad mediada por el complemento (Domenech *et al.*, 2014; Domenech *et al.*, 2015; Moscoso *et al.*, 2006; Yuste *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, es necesario continuar con la vigilancia y caracterización de los aislados no vacunales emergentes que causan enfermedad neumocócica, con el fin de comprender mejor qué características bacterianas conducen al éxito de ciertos secuencitipos.

## 2. IMPACTO DEL HT EN LA ENFERMEDAD NEUMOCÓCICA

La ENI, como ya se ha comentado, viene precedida por la colonización de la nasofaringe, que es particularmente común en niños, con más de un serotipo colonizando un mismo individuo al mismo tiempo (Shak *et al.*, 2013). Afecta principalmente a niños, personas mayores y pacientes inmunocomprometidos (Henriques-Normark y Tuomanen, 2013). No obstante, neumococo también es la principal causa de enfermedades no invasivas como neumonía no bacteriémica, otitis media aguda, sinusitis y conjuntivitis. Además, este microorganismo desempeña un papel importante causando exacerbaciones agudas recurrentes en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, como es la EPOC donde, en ocasiones, posee la capacidad de persistir durante largos periodos de tiempo (Domenech *et al.*, 2012; Domenech *et al.*, 2011).

En principio, se considera que las vías respiratorias inferiores en individuos sanos no están colonizadas por bacterias mientras que, en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas, como la EPOC o la bronquiectasia, están, generalmente y de manera persistente, colonizadas por patógenos respiratorios (Sethi y Murphy, 2008; Zalacain *et al.*, 1999). La colonización de las vías respiratorias en estos pacientes se debe principalmente a *P. aeruginosa*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, los cuales contribuyen progresivamente al daño pulmonar, aumentando la mortalidad y el riesgo de muerte de estos individuos debido a los frecuentes y recurrentes episodios de exacerbaciones agudas (Sethi y Murphy, 2008). La alta prevalencia de bacterias que colonizan las vías respiratorias distales está principalmente relacionada con el grado de obstrucción respiratoria, por la disminución de la mucosa ciliar y el consumo de tabaco (Zalacain *et al.*, 1999).

El desarrollo de episodios de EA causados por *S. pneumoniae* está asociado con la adquisición continuada de una cepa nueva de neumococo con diferente serotipo/genotipo o de una especie bacteriana diferente (Sethi *et al.*, 2002; Sethi y Murphy, 2008; Zalacain *et al.*, 1999). La colonización bacteriana persistente en pacientes con EPOC severa está frecuentemente asociada a *P. aeruginosa* (Domenech *et al.*, 2012). Sin embargo, se sabe poco de la evolución de neumococo para dar lugar a múltiples episodios de EA, durante largos periodos de tiempo, en pacientes con enfermedades respiratorias crónicas. Se ha propuesto que las cepas de neumococo que son capaces de colonizar de manera persistente y están asociadas a múltiples episodios de EA en estos pacientes, han podido adquirir, con el tiempo, cambios en factores determinantes de la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, macrólidos y fluoroquinolonas (Domenech *et al.*, 2012). Es cierto que la alta prevalencia en estos pacientes de neumococos multirresistentes asociados a la EA se debe, en parte, al consumo de antimicrobianos como tratamiento empírico (Hakenbeck *et al.*, 1999; Liñares *et al.*, 1992). En estudios con aislados persistentes de neumococo se ha demostrado que la mayoría de los genes involucrados en la resistencia antimicrobiana se mantienen estables en el tiempo, a excepción de los genes *parC* y *gyrA*, que están asociados con el desarrollo de resistencia a fluoroquinolonas, después de recibir tratamiento. Sin embargo, un dato importante a tener en cuenta es que el desarrollo de la EPOC está estrechamente asociado al tabaquismo. El consumo de tabaco es el principal factor de riesgo en el desarrollo de esta enfermedad. En términos globales, la EPOC afecta al 10% de la población total y al 50% de los fumadores habituales en países industrializados, donde es la

cuarta causa de muerte, y está previsto que en 2020 pueda llegar a ser la tercera a nivel mundial (López, 2012; Rabe *et al.*, 2007). Diversos estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a HT es el factor principal de riesgo para sufrir infecciones por *S. pneumoniae* (Grigg *et al.*, 2012; Voss *et al.*, 2015). De hecho, el riesgo de sufrir neumonía neumocócica es mayor tanto en los fumadores activos como en los pasivos (Nuorti *et al.*, 2000; van der Poll y Opal, 2009). Sin embargo, los mecanismos que explicarían esta asociación no están del todo claros.

Un estudio del Hospital Universitari de Bellvitge, en Barcelona, describió la asociación existente ente ciertos serotipos y genotipos de neumococo con el desarrollo de neumonías o exacerbaciones agudas en la EPOC afirmando que, en España, los aislados clínicos de los serotipos 11A y 16F, así como los neumococos no tipificables son los que se asocian más frecuentemente a exacerbaciones y episodios de neumonías recurrentes en pacientes que sufren EPOC. En concreto, el ST30<sup>16F</sup> fue más frecuentemente aislado durante los episodios de EAEPOC (Domenech *et al.*, 2011). Este hecho resulta importante y puede ser una potencial amenaza en el futuro, ya que el serotipo 16F, al igual que se ha comentado anteriormente para el serotipo 11A, no está incluido en la PCV13. Por lo tanto, es interesante comprender las bases moleculares de los mecanismos de patogenicidad por los cuales los serotipos 11A y 16F de *S. pneumoniae* están asociados a cronicidad y persistencia pulmonar en los enfermos de EPOC e investigar el efecto de la exposición del HT en la ENI. En el presente estudio, se seleccionaron 5 aislados clínicos de los serotipos 11A y 16F procedentes de pacientes con EPOC o ENI (n = 20), y, también, se trabajó con aislados denominados en esta Tesis Doctoral como súper EPOC y tipo EPOC, resultado de multiplicar los aislados clínicos de EPOC o ENI, respectivamente, durante 10 pases sucesivos en presencia de 1% de EHT.

Un componente clave de las respuestas inmunes innata y adquirida cuya funcionalidad puede verse afectada por la exposición al HT es el sistema del complemento. Como ya se comentó en la introducción de esta Memoria (véase Apto. 3.1.1), la activación de la vía clásica del complemento puede producirse por anticuerpos específicos o por proteínas de fase aguda. En este sentido, la proteína CRP, al igual que SAP, reconoce la PCho y puede iniciar la activación de esta vía del sistema del complemento, lo que conlleva a un incremento de la fagocitosis de este patógeno (Yuste *et al.*, 2007; Yuste *et al.*, 2008). El estudio de la cantidad de PCho unida a los WTA y LTA en los aislados procedentes de pacientes con EPOC y en aislados de ENI, demuestra que la expresión de PCho en la superficie bacteriana es mayor en los aislados clínicos de ENI que en los obtenidos de EAEPOC. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores para aislados persistentes de *H. influenzae* no tipificables (NTHi), los cuales no encuentran ninguna correlación entre el contenido de PCho presente en el lipooligosacárido de aislados persistentes de NTHi y las cepas aisladas por primera vez durante un episodio de EA en pacientes con EPOC (Garmendia *et al.*, 2014). Los resultados de esta Tesis, además, revelaron que los aislados de ENI eran reconocidos de un modo más eficiente por las proteínas CRP y C3b que los aislados persistentes de pacientes con EPOC. En este sentido, nuestros resultados demuestran que los aislados obtenidos de pacientes con EPOC son más refractarios al reconocimiento por el sistema del complemento que los aislados responsables de producir ENI. Esto concuerda con la observación previa de Clark y Weiser (2013) de que una gran cantidad de patógenos que contienen PCho en la superficie, entre ellos las especies bacterianas

que colonizan el tracto respiratorio superior y aquellas que son capaces de producir enfermedades crónicas en el pulmón, son capaces de modular el contenido de este aminoalcohol para sobrevivir, evitando ser reconocidos por el sistema inmune del hospedador. En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que la disminución observada del contenido de PCho es resultado de la exposición de la bacteria al HT dando lugar a una mayor capacidad de evasión de la respuesta inmune y, por tanto, podría contribuir a la capacidad de estos aislados de permanecer durante largos periodos de tiempo en los pulmones de los pacientes con EPOC. Esto fue confirmado al observar una disminución significativa de los niveles de expresión de PCho en la superficie de neumococo cuando ambos tipos de aislados fueron expuestos, en condiciones del laboratorio, a 1% de EHT. Esta conclusión fue corroborada al observarse que los aislados de neumococo mostraban un menor reconocimiento por la proteína CRP tras ser multiplicados en presencia de EHT. En conjunto, los resultados obtenidos apoyan algunas hipótesis que sugieren que la exposición al HT puede incrementar la virulencia de determinados microorganismos que colonizan el tracto respiratorio al modificar la expresión de genes de virulencia (Mutepe *et al.*, 2013; Underhill y Goodridge, 2012). Este punto es de gran importancia, ya que se ha comprobado que la PCho expresada en la superficie bacteriana puede afectar a la adhesión celular y al reconocimiento inmune (Clark y Weiser, 2013). Además, se ha descrito que la inmunidad del complemento se ve directamente afectada por la exposición al HT mediante la inducción de quimioquinas plasmáticas, anafilotoxinas y reclutamiento de las células fagocíticas del pulmón (Yin *et al.*, 2008). Una posible alternativa por la que el HT podría afectar al sistema inmune podría ser debido a determinados componentes del tabaco, como es el caso de la glicoproteína del tabaco que interacciona directamente con el primer componente de la vía clásica C1q activando esta cascada y, por consiguiente, aumentando los niveles de C3b del suero, como se ha encontrado en niños que viven en casas con fumadores respecto a los que viven en viviendas libres de HT (Koethe *et al.*, 1995; Wills-Karp, 2007). Estos datos apoyan la hipótesis de que la exposición al HT podría afectar a la susceptibilidad del hospedador frente a las infecciones producidas por *S. pneumoniae* y, por tanto, a las exacerbaciones frecuentes en pacientes con EPOC.

La fagocitosis es un elemento importante de la respuesta inmune innata para la eliminación de microorganismos invasores (Underhill y Goodridge, 2012). El pulmón contiene células fagocitarias que actúan como centinelas y que constituyen una de las primeras líneas de defensa celular frente a la infección, participando activamente en la eliminación de neumococo del pulmón. Nuestros resultados con neutrófilos humanos no mostraron diferencias significativas cuando se compararon los aislados procedentes de pacientes con EPOC con los aislados obtenidos de ENI. Sin embargo, sí mostraron una drástica disminución de la capacidad de los neutrófilos para reconocer y fagocitar a las cepas multiplicadas en presencia de 1% de EHT (súper EPOC y tipo EPOC) respecto a los aislados silvestres. Esto es de gran relevancia teniendo en cuenta los resultados anteriores, ya que las proteínas de fase aguda son capaces de inducir la fagocitosis de neumococo (Bharadwaj *et al.*, 2001; Botelho y Grinstein, 2011; Yuste *et al.*, 2007). El hecho de que no se encontrasen, inicialmente, diferencias entre los aislados silvestres de EPOC y ENI puede deberse al diferente fondo genético de los aislados clínicos, ya que procedían de distintos pacientes. La importancia de esto residen en que existen numerosas

proteínas de neumococo involucradas en la evasión de la fagocitosis, de modo que la presencia, por ejemplo, de distintos polimorfismos en alguna de ellas entre los diferentes aislados, podría afectar a los niveles de interacción de éstos con las células fagocitarias (Kadioglu *et al.*, 2008; van der Poll y Opal, 2009). Utilizar cepas con el mismo fondo genético, expuestas o no a EHT, sí que ha permitido observar diferencias significativas en la capacidad de ser reconocidas por los neutrófilos PMN, lo que confirma que la exposición de neumococo al HT incrementa la capacidad del microorganismo para eludir la fagocitosis. Estos resultados demuestran, además, que el consumo continuado de tabaco es una de las causas de la resistencia desarrollada por neumococo a la respuesta inmune del hospedador y corroboran lo expuesto por estudios previos de otros autores, que demuestran que la exposición al HT favorece la susceptibilidad a las infecciones ya que dificulta la respuesta fagocítica del hospedador (Martí-Llitas *et al.*, 2009; Phipps *et al.*, 2010).

El HT puede favorecer la infección respiratoria por neumococo mediante la alteración de una gran cantidad de receptores implicados en el reconocimiento de patógenos. A su vez, la presencia de bacterias colonizando el tracto respiratorio inferior es la mayor causa del daño crónico inducido por la inflamación. La EPOC está caracterizada por presentar una respuesta inmune alterada. En este sentido, se ha demostrado que la exposición aguda a HT suprime la actividad funcional de los macrófagos (Martí-Llitas *et al.*, 2009; Metcalfe *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2017) y, en la misma línea, se ha descrito que el proceso de fagocitosis de los macrófagos de pacientes con EPOC está disminuido en comparación a los de pacientes control (Yin *et al.*, 2008). La existencia de fagocitos defectivos permite a la bacteria persistir en las vías respiratorias lo que lleva, entre otras consecuencias, al incremento de la estimulación de los TLRs por parte de estas bacterias persistentes (Metcalfe *et al.*, 2014). Existen evidencias científicas que confirman que los pacientes fumadores y los pacientes con EPOC presentan niveles incrementados de TLR4 y TLR9 en las células T CD8<sup>+</sup> pulmonares. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral en relación a TLR4 corroboran este efecto, demostrando que la presencia de EHT incrementa, de manera concentración-dependiente, los niveles de expresión de este receptor. En este estudio no se ha conseguido determinar la expresión de TLR9 (datos no mostrados), debido a su localización intracelular, pero existen otros trabajos que afirman que su expresión también se encuentra incrementada en modelos animales y en el tejido pulmonar de pacientes con EPOC (Foronjy *et al.*, 2016). Aunque, los TLRs combaten la infección, su incremento por exposición a un agente mutagénico de manera persistente —como es el HT— altera la función del sistema inmune. El incremento de TLR9 se ha demostrado que inactiva proteínas con actividad antiinflamatoria e incrementa la expresión de citoquinas proinflamatorias por lo que, en último término, la exposición continuada a HT altera la interacción natural de los macrófagos alveolares con la bacteria reduciendo la capacidad fagocítica de aquellos y alterando la respuesta innata frente a microorganismos patógenos (Foronjy *et al.*, 2016).

Además de los ya mencionados TLRs, en la superficie de las células fagocíticas se exponen una gran variedad de receptores que son capaces de interactuar con ciertos ligandos expresados por diferentes patógenos microbianos, promoviendo su internalización y, finalmente, su eliminación (Arredouani *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2006; Stuart y Ezekowitz, 2005; Underhill y Goodridge, 2012). Ciertos patógenos intracelulares han desarrollado estrategias muy

sofisticadas utilizando diferentes receptores específicos del hospedador para su propio beneficio, con el fin de penetrar en las células eucarióticas y poder replicarse (Cossart y Sansonetti, 2004; Rosenberger y Finlay, 2003). Este es el caso de patógenos intracelulares obligados como *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* y el enterovirus 71 que acceden al interior celular mediante su unión al receptor PSGL-1 causando, respectivamente, anaplasmosis granulocítica, ehrlichiosis granulocítica y el denominado exantema vírico de manos, pies y boca (Nishimura *et al.*, 2009; Romero-Steiner *et al.*, 1997). Las células HL-60 expresan los mismos receptores fagocíticos que los neutrófilos de sangre periférica, incluyendo CR1, CR3, Fc y PSGL-1 entre otros, que son utilizados para fagocitar a *S. pneumoniae* o para el reconocimiento y entrada de *A. phagocytophilum* (Park *et al.*, 2003; Romero-Steiner *et al.*, 1997; Troese y Carlyon, 2009). De entre los receptores que participan en la fagocitosis, los más estudiados han sido los Fc $\gamma$ R donde, de los diferentes tipos existentes, las isoformas Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA y Fc $\gamma$ RIIIA son capaces de mediar la fagocitosis en humanos (García-García y Rosales, 2002; Joshi *et al.*, 2006). Se ha demostrado el efecto protector de CRP mediando la fagocitosis directa a través de los macrófagos y neutrófilos derivados del sistema circulatorio (Szalai *et al.*, 1996). CRP favorece la fagocitosis y la producción de citoquinas mediante su unión a los receptores Fc $\gamma$ RI y Fc $\gamma$ RII de los leucocitos (Mold *et al.*, 2002), tanto humanos como murinos, los cuales se incrementan en las infecciones neumocócicas (Mold y Du Clos, 2006; Mortensen y Duszkiwicz, 1977; Thomas-Rudolph *et al.*, 2007). Sin embargo, el mecanismo por el cual se produce la protección frente a *S. pneumoniae* aún no está claro, pero es probablemente menor a la demostrada a través del sistema del complemento (Mold *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha demostrado que PSGL-1 es un receptor funcional de leucocitos involucrado en el reconocimiento y fagocitosis de *S. pneumoniae* y que desempeña un papel crucial como mecanismo de defensa frente a la ENI. Utilizando un modelo de neumonía y sepsis empleando ratones deficientes en PSGL-1, se ha observado que la bacteria se replica descontroladamente en la sangre, permitiendo un rápido desarrollo de la infección (Ramos-Sevillano *et al.*, 2016). Los resultados de esta Tesis Doctoral han demostrado que la exposición de los neutrófilos PMN a EHT se traduce en una menor capacidad de éstos para fagocitar a neumococo y que ello es debido a una disminución significativa en los niveles de expresión de dos receptores esenciales de las células fagocíticas, Fc $\gamma$ RII y PSGL-1. Nuestros resultados muestran que esta disminución es más acentuada cuanto más alta es la concentración de EHT a la que son expuestas las células. Otros autores han descrito que el EHT afecta a la fagocitosis mediada por el complemento, pero no a la mediada por IgGs opsonizadas, es decir, a la fagocitosis mediada por Fc $\gamma$ R. De la misma manera, se ha afirmado que la fagocitosis por macrófagos alveolares no se ve afectada por el EHT cuando la bacteria no es opsonizada (Phipps *et al.*, 2010). Sin embargo, nuestros resultados demuestran que el HT no solamente disminuye la expresión de los receptores Fc $\gamma$ RII y PSGL-1 sino que, además, disminuye la fagocitosis de neumococo en ausencia de componentes del suero. Teniendo en cuenta que PSGL-1 está involucrado en la fagocitosis de *S. pneumoniae* y que en presencia de EHT se ha observado que tanto la expresión del receptor como la fagocitosis de la bacteria disminuyen de la misma manera, los resultados de esta Tesis Doctoral sugieren que la persistencia pulmonar de los aislados de neumococo procedentes de pacientes EPOC podría deberse, en parte, a la menor capacidad

fagocítica de los neutrófilos PMN. Esta menor fagocitosis estaría causada, al menos parcialmente, por la disminución en la expresión del receptor PSGL-1 en su superficie, como consecuencia de la exposición continuada a HT en estos pacientes. Además, los ensayos en modelos animales muestran que los ratones silvestres que han sido expuestos durante dos semanas a EHT, a diferencia de los PSGL-1<sup>-/-</sup>, presentan a nivel de sangre periférica mayores niveles de expresión de la metaloproteasa ADAM8 tanto en las células granulocíticas como en las diferentes subpoblaciones de células sanguíneas (linfocitos B, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>). Esto resulta interesante, dado que ADAM8 está implicado en la reducción de la expresión de PSGL-1 en la superficie celular cuando los neutrófilos, una vez infiltrados, necesitan disminuir su adhesividad a los vasos sanguíneos. Por tanto, el conjunto de estos resultados permite profundizar en el conocimiento de las bases de la persistencia pulmonar de los aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC. La exposición a HT reduce la expresión de los niveles de PSGL-1 debido al aumento de ADAM8, que actúa liberando de manera más eficaz PSGL-1 de la superficie celular y, por tanto, disminuyendo la capacidad de las células fagocitarias para reconocer y eliminar a neumococo. El hecho de que no se detectara PSGL-1 en las células pulmonares de ratones silvestres no expuestos a EHT (datos no mostrados), probablemente, se debe a que PSGL-1 es liberado de la membrana celular durante el proceso de aislamiento de las células del tejido. En relación a la respuesta inflamatoria celular, la EPOC se caracteriza por un incremento de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el parénquima pulmonar y en el tracto traqueo-bronquial que contribuye a la intensa respuesta inflamatoria característica de estos pacientes (O'Shaughnessy *et al.*, 1997; Saetta *et al.*, 1998). En nuestro estudio, no se encontraron diferencias significativas en el número de células del sistema inmune infiltrando los pulmones o la sangre periférica tras la exposición o no al EHT en ambos grupos de ratones (datos no mostrados). Una posible explicación podría ser que la exposición *in vivo* a EHT durante 2 semanas no sea tiempo suficiente para producir un efecto marcado sobre dichas poblaciones celulares como ocurriría en los pacientes con EPOC con un largo historial fumador.

Otro de los aspectos que favorecen las exacerbaciones de etiología infecciosa es el proceso de adhesión de *S. pneumoniae* al epitelio respiratorio. En este proceso están involucrados ligandos y proteínas de la superficie del patógeno, como la PCho presente en la pared celular bacteriana y receptores del propio hospedador (Grigg *et al.*, 2012). En el caso de los aislados de NTHi, que son junto con neumococo una importante causa de exacerbaciones agudas en pacientes con EPOC, existen resultados discrepantes en términos de interacción con el epitelio pulmonar. Algunos autores han observado que los aislados de NTHi procedentes de pacientes con EAEPOC presentan una mayor adhesión a células epiteliales del pulmón, incrementándose, como consecuencia, la producción de IL-8 y favoreciendo así el proceso inflamatorio característico en de la enfermedad (Chin *et al.*, 2005). Sin embargo, contradiciendo esto, otros estudios describen una menor tasa de adhesión en los aislados NTHi persistentes de pacientes con EPOC y la menor producción de IL-8, posiblemente, con el objetivo de reducir la llegada de células inflamatorias al sitio de infección evitando la activación de la respuesta inmune celular (Garmendia *et al.*, 2014). En el caso de *P. aeruginosa* se ha descrito que los aislados persistentes, que producen infección recurrente en pacientes con fibrosis quística, se adhieren e internalizan peor al epitelio respiratorio produciendo, sin embargo, una elevada respuesta

inflamatoria (Chin *et al.*, 2005; Hawdon *et al.*, 2010). En la presente Tesis Doctora, el estudio de la interacción entre *S. pneumoniae* y el epitelio respiratorio humano ha mostrado que los aislados de neumococo capaces de producir cronicidad poseen una mayor capacidad de adhesión a las células A549 y que, además, dicha adhesión se ve altamente incrementada cuando las células son expuestas a EHT, en comparación con los aislados de ENI. Estos resultados están relacionados con lo descrito, y comentado anteriormente, por Chin y cols. (2015) para NTHi. Desde el punto de vista del proceso invasivo del epitelio respiratorio, la capacidad invasora de los aislados obtenidos de ENI aumentó cuando las células pulmonares se incubaron en presencia de EHT. Sin embargo, la baja capacidad invasiva de los aislados de EPOC no se incrementó cuando las cepas se multiplicaron en presencia de EHT. Estos resultados apoyan lo descrito por ciertos autores que afirman que neumococo invade el pulmón mediante la interacción con el PAFr gracias a que dispone de PCho en su superficie, al igual que el ligando natural PAF (Cundell *et al.*, 1995; Hermoso *et al.*, 2005). En este sentido, también se ha descrito que las células endobronquiales de pacientes fumadores y con EPOC presentan mayores niveles de PAFr que las de individuos no fumadores y sanos (Suri *et al.*, 2014). De la misma manera, las células epiteliales bronquiales expuestas a EHT tienen incrementada la expresión de PAFr, y, de manera concomitante, la adhesión de neumococo a las mismas (Shukla *et al.*, 2016). Los resultados del presente estudio apoyan la hipótesis de que la capacidad de neumococo para modificar la expresión de PCho en su superficie proporciona a la bacteria una ventaja evolutiva durante la infección al hospedador. Sin embargo, dicha capacidad de variar la expresión de PCho puede ser beneficiosa sólo en determinadas condiciones del hospedador.

En esta Tesis Doctoral se ha demostrado que el hecho de que los aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC tengan menores niveles de PCho, permite a la bacteria eludir la inmunidad mediada por el complemento y la fagocitosis. Sin embargo, a pesar de favorecer la evasión del sistema inmune por parte de la bacteria, supone el inconveniente de dificultar la interacción de ésta con el PAFr. Como consecuencia de ello, la capacidad de invasión del epitelio pulmonar se ve disminuida en los aislados clínicos de pacientes con EPOC y en las cepas de neumococo que han sido expuestas al efecto del HT en comparación a la capacidad invasora de los aislados clínicos procedentes de pacientes con ENI. En cambio, los aislados invasivos de neumococo, al expresar mayores niveles de PCho en la superficie bacteriana, pueden interaccionar de manera más eficaz con el PAFr, diseminarse e invadir mejor el tracto respiratorio, alcanzando el torrente circulatorio y produciendo, de esta manera, infección sistémica. Los resultados obtenidos apoyan el origen de estas últimas cepas mencionadas, ya que se aislaron de pacientes con enfermedad invasiva no asociada a individuos fumadores habituales, según la historia clínica. De manera adicional a la importancia de los diferentes niveles de expresión de PCho en la superficie de los diferentes tipos de aislados, cabe destacar el gran incremento, mostrado por los ensayos de citometría de flujo, en la expresión del PAFr en presencia de 1 y 5% de EHT, que agrava la situación al incrementar la capacidad de neumococo de invadir las células epiteliales y producir ENI. El hecho de que la expresión del receptor se incremente de manera concentración-dependiente es importante, ya que supone que nuestros estudios *in vitro* confirman evidencias clínicas en las que se demuestra que la cantidad de cigarrillos que se fuman al día afecta de manera directamente proporcional al desarrollo de ENI

(Nuorti *et al.*, 2000).

La exposición de ratones a EHT y la infección posterior de los mismos con un aislado procedente de ENI (1722R4<sup>16F</sup>) o con un aislado tipo EPOC (1722R4HT<sup>16F</sup>), demostró que la exposición al humo de tabaco favorece la colonización del tracto respiratorio por parte de neumococo, contribuyendo al desarrollo de un fenotipo bacteriano de infección respiratoria persistente, que es característico de pacientes con EPOC. Sin embargo, teniendo en cuenta que la expresión del PAFr se incrementa en presencia del HT cabría esperar una virulencia mucho más marcada de la cepa 1722R4<sup>16F</sup>, debido a la presencia de un mayor contenido de PCho en la superficie bacteria de ésta en comparación a la cepa 1722R4HT<sup>16F</sup> que habría favorecido el proceso invasivo a través de dicho receptor. Una posible explicación a estos resultados puede ser que la exposición de los ratones al EHT se interrumpió en el momento en el que los animales fueron infectados con los diferentes aislados de neumococo, así como tampoco se continuó a dicha exposición los días posteriores, en los que se monitorizó el estado de salud de estos. Este aspecto es importante, ya que se ha descrito, recientemente, que el cese de la exposición a HT produce la recuperación de los animales del proceso infeccioso, sugiriéndose en este trabajo que abandono del hábito de fumar es la mejor estrategia para combatir la ENI (Shen *et al.*, 2016). Basándonos en los resultados de estos autores, cabe la posibilidad de que si en los ratones de nuestro estudio se hubiera mantenido la exposición al EHT durante los días posteriores a la infección, quizás se habrían obtenido mayores diferencias de mortalidad entre la infección con la cepa 1722R4<sup>16F</sup> y la cepa 1722R4HT<sup>16F</sup>.

Analizando conjuntamente los resultados obtenidos, en esta Memoria se destaca el importante papel que posee el PAFr en la unión y translocación de neumococo al interior de las células epiteliales de pulmón en presencia de EHT. Además, las imágenes de microscopía confocal sugieren que la invasión de neumococo a través del epitelio pulmonar se produce a través de dicho receptor, lo que apoya el estudio de Radin y cols. (2005) en el que demostraron una co-localización del 82% entre PAFr y *S. pneumoniae* en células endoteliales cerebrales. Sin embargo, existen autores que afirman que la interacción entre neumococo y el PAFr en las células endoteliales cerebrales derivadas de meningitis bacteriémica es indirecta, siendo, en realidad, la interacción física durante la adhesión con el receptor endotelial plgR, aunque al igual que otros autores, éstos no detectaron plgR en células A549 (Iovino *et al.*, 2014). Diversos investigadores han demostrado la implicación del PAFr en la adhesión de diferentes patógenos. *Neisseria meningitidis* es capaz de unirse al PAFr en las células epiteliales de las vías respiratorias a través de los residuos de PCho (Jen *et al.*, 2013). De la misma manera, se ha sugerido que *H. influenzae* se une por interacción de la PCho de la superficie celular con el PAFr (Shukla *et al.*, 2016). Esto es relevante desde la perspectiva infecciosa ya que si el hábito de fumar y, por tanto, la exposición al efecto del HT modifica, como ya se ha comentado, receptores de células del hospedador implicados en el reconocimiento y/o en la eliminación de microorganismos y, de igual modo, afecta a la virulencia bacteriana, nuestros resultados podrían ser extrapolables a otras bacterias que contienen PCho en su estructura y colonizan al ser humano (Clark y Weiser, 2013). En este sentido, tanto *H. influenzae*, como *P. aeruginosa* presentan PCho en su estructura y producen infecciones respiratorias persistentes del tracto respiratorio (Clark y Weiser, 2013; Garmendia *et al.*, 2012b). En el caso de meningococo, que

también contiene PCho, la exposición de esta bacteria al efecto del HT en fumadores habituales, así como su exposición en fumadores pasivos podría desencadenar o favorecer el desarrollo de enfermedad meningocócica grave, como apuntan algunos autores (Coen *et al.*, 2006; Murray *et al.*, 2012).

Una forma de combatir la infección neumocócica podría ser bloqueando el PAFr con el fin de evitar la diseminación sistémica (Cundell *et al.*, 1995). La utilización de modelos animales deficientes en PAFr han demostrado que estos ratones sobreviven en mayor proporción y presentan un menor número de bacterias en sangre que los ratones silvestres (Rijneveld *et al.*, 2004). En esta Tesis Doctoral, se utilizó el compuesto ABT-491, que es un antagonista del PAFr y que ha sido empleado con éxito en modelos *in vivo* de rinitis alérgica (Albert *et al.*, 1998) y en hipoxia cerebral isquémica (Bozlu *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se administró el compuesto ABT-491 por vía intranasal en modelos murinos de neumonía neumocócica, además de no mostrar una mayor protección frente a la neumonía neumocócica, se observó que los pulmones de los animales presentaban una marcada alteración en la permeabilidad vascular con cierto grado de hemorragia a nivel pulmonar (datos no mostrados). Por ello, se decidió no continuar con esta parte del proyecto.

Un aspecto importante en los pacientes con EPOC es que sufren frecuentemente episodios de exacerbaciones agudas durante el curso de la enfermedad contribuyendo a empeorar el estado de salud, la prognosis y ocasionando, en consecuencia, un incremento del gasto sanitario (Sethi *et al.*, 2002; Sethi y Murphy, 2008). Una característica fisiopatológica asociada al desarrollo de la EA y la progresión de la EPOC es la inflamación persistente que está asociada a esta enfermedad y, por ello, los pacientes que la sufren son tratados habitualmente con fármacos antiinflamatorios. En el caso de la enfermedad neumocócica existe bastante debate sobre el efecto beneficioso o perjudicial de la administración de corticoides. Algunos estudios indican que la administración de corticoides es beneficiosa disminuyendo las EA y, por tanto, mejorando la función pulmonar y la sintomatología de estos pacientes (Barbier *et al.*, 2008; Burge *et al.*, 2000; Calverley *et al.*, 2003; Mahler *et al.*, 2002). Sin embargo, otros autores han observado un aumento de la incidencia, así como del riesgo de muerte por neumonía adquirida en la comunidad en pacientes con EPOC tratados con algunos corticoides como la fluticasona (Ernst *et al.*, 2007; Patterson *et al.*, 2012). En este trabajo de Tesis Doctoral, se analizó el efecto de los corticoides dexametasona y fluticasona en la interacción entre *S. pneumoniae* y el epitelio respiratorio. Estos fármacos redujeron la capacidad de adhesión e invasión de *S. pneumoniae* a células A549 respecto a la observada en las células control, siendo este efecto más pronunciado en la disminución de la adhesión. Aunque sería necesario ampliar este estudio utilizando estos compuestos en modelos animales de neumonía neumocócica, los resultados obtenidos *in vitro* sugieren que el tratamiento con este tipo de corticoides podría ser beneficioso para combatir las posibles recidivas de neumonía en pacientes con EPOC al afectar de manera significativa a la adhesión de neumococo a las células pulmonares, como apuntan algunos estudios (Barbier *et al.*, 2008).

### 3. PAPEL DE LA AUTOLISINA LYTA Y LA ESTERASA PCE EN LA MODULACIÓN DEL CONTENIDO EN PCHO DE LOS AISLADOS DE NEUMOCOCCO CAPACES DE PERSISTIR EN LOS PULMONES DE PACIENTES CON EPOC

El papel biológico de la colina en el proceso de infección por microorganismos patógenos es un aspecto de gran interés debido a su implicación como mecanismo de evasión de la respuesta inmune del hospedador. La colina es un nutriente esencial en los humanos, ya que es requerida para la síntesis de diversas moléculas como los lípidos de la membrana celular, la metionina, el PAF o el neurotransmisor acetilcolina (Zeisel, 2007). Sin embargo, la presencia de PCho también es necesaria y beneficiosa para los microorganismos patógenos. Como consecuencia de ello, muchos microorganismos han desarrollado estrategias para emplear la PCho disponible en el hospedador en su propio beneficio. De esta manera, *S. pneumoniae*, que es auxótrofo para la colina, cuando el aminoalcohol está presente en el medio puede transportarlo al interior celular, transformarla en PCho e incorporarla a los WTA y LTA, utilizando proteínas codificadas por genes situados en el locus *lic* (Zhang *et al.*, 1999). Además, la mayoría de estos microorganismos han desarrollado la capacidad de variar la expresión y la localización de este aminoalcohol. En *S. pneumoniae*, la PCho sirve como anclaje para las CBPs que también están implicadas en los mecanismos de evasión del sistema inmune del hospedador. Teniendo en cuenta que los aislados EPOC y tipo EPOC presentan menores niveles de PCho que los aislados ENI y que ello podría explicar la mayor persistencia pulmonar de estos aislados en los pacientes con EPOC, resulta importante conocer en detalle las bases biológicas de este proceso. En este estudio se construyeron mutantes isogénicos en *pce* y *lytA* para los distintos aislados procedentes de EPOC y ENI de los serotipos 11A y 16F. Se ha descrito que estas dos proteínas son capaces de reducir el contenido de PCho en la envoltura bacteriana, de manera directa la primera —eliminando los residuos más externos de PCho en el peptidoglicano— o indirecta la segunda al eliminar fragmentos de la pared celular con residuos de PCho unida a la misma (Hermoso *et al.*, 2005; Ramos-Sevillano *et al.*, 2015).

Los resultados de esta Tesis Doctoral, empleando cepas mutantes en *pce* y *lytA* demuestran que estas proteínas participan modulando eficientemente el contenido en PCho de la superficie de los aislados de pacientes con EPOC y, consecuentemente, afectando al reconocimiento de los mismos por el sistema inmune. En estos aislados, la cantidad de PCho en la superficie bacteriana fue significativamente mayor en los mutantes en *pce* y *lytA* que en los aislados silvestres o que en los mismos mutantes contruidos en aislados clínicos de ENI. Según nuestros resultados, cuando Pce y LytA están presentes y funcionalmente activas en los aislados de EPOC son mucho más eficaces reduciendo el contenido en PCho que en los aislados de ENI. Además, se ha comprobado que este hecho tiene implicaciones funcionales, ya que al presentar menos PCho en la superficie se dificulta el reconocimiento por proteínas de fase aguda, así como por el sistema del complemento y las células fagocitarias. Resultados previos de Hergott y cols. (2015) habían mostrado que no existían diferencias entre aislados silvestres y mutantes en *pce* en términos de sensibilidad al depósito del complemento, niveles de expresión de la cápsula o presencia de PCho en la superficie bacteriana. Sin embargo, existe un matiz importante que diferencia nuestro trabajo de éste y es que los autores del estudio de referencia emplearon

únicamente un aislado clínico del serotipo 23F procedente de un niño con otitis media aguda que, por tanto, no era un aislado de paciente EPOC ni de un individuo con hábito de fumar (McCool y Weiser, 2004). En línea con nuestros hallazgos, en un trabajo previo, de las Rivas y cols. (2001) sugirieron que en ausencia de *pce* las cepas de neumococo deberían mostrar mayores niveles de colina en la pared celular mostrando, además, una morfología más transparente y una mayor adherencia a células eucariotas. Para ello, se basaron en resultados previos que demostraban que las cepas con menor contenido en PCho, como las variantes opacas de neumococo, escapaban del reconocimiento por el sistema inmune en el torrente sanguíneo. Asimismo, se ha propuesto que Pce, al eliminar una parte de los residuos de PCho (al menos los más expuestos al exterior celular) podría disminuir el reconocimiento de la bacteria por la proteína CRP del hospedador y, con ello, el reconocimiento por las células fagocitarias (Hermoso *et al.*, 2005; Kharat y Tomasz, 2006).

El estudio mediante *western blot* para detectar el nivel de expresión de las proteínas Pce y LytA en los aislados EPOC, ENI y cepas tipo EPOC de los aislados de los serotipos 11A y 16F, no permitió observar diferencias entre los distintos aislados que pudieran explicar las posibles variaciones de actividad de las mismas. Por el contrario, los ensayos para determinar la actividad lítica de la proteína LytA en las diferentes cepas revelaron diferencias en las curvas de crecimiento de éstas. Tanto los aislados de pacientes de EPOC como las cepas tipo EPOC se lisaron antes que los aislados ENI, sugiriendo que la actividad de la principal autolisina de neumococo sí se encuentra incrementada en los aislados que habían sido expuestos a HT. Sin embargo, el análisis genómico de las secuencias de los genes *pce*, *lytA* y, por la relación existente con *lytA*, de *ply* de los 80 aislados (EPOC, tipo EPOC y ENI) secuenciados, parece sugerir que los cambios producidos por el HT no afectarían, al menos directamente, a la actividad específica descrita para estas proteínas.

Al comienzo de esta Tesis se conocía la existencia un gran polimorfismo en las proteínas LytA y Ply, aunque esta última había sido considerada, en principio, como una proteína bien conservada (Mitchell *et al.*, 1990). Sin embargo, se han descrito, recientemente, más de 20 diferentes variantes alélicas de Ply, demostrándose, además, que algunos de estos alelos carecen de actividad hemolítica (Jefferies *et al.*, 2007; Kirkham *et al.*, 2006; Lock *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 2015). Existen estudios que señalan que la ausencia de actividad hemolítica de la proteína podría estar asociada con una mayor capacidad de *S. pneumoniae* para colonizar (Kirkham *et al.*, 2006). Además, se ha propuesto que existe una distribución de los alelos Ply asociada al complejo clonal al que pertenecen los aislados, lo cual relaciona la actividad específica en función de la capacidad de los aislados de neumococo para invadir o permanecer en estado de portador (Jefferies *et al.*, 2010). Se planteó que los aislados de EPOC o tipo EPOC presentasen una menor actividad específica de Ply en comparación con los aislados ENI. Esta sugerencia se basó en que ciertos serotipos y genotipos de neumococo están más frecuentemente asociados a EAEPOC y, por tanto, tienen una mayor capacidad para persistir en los pulmones de estos pacientes, como es el caso del ST30<sup>16F</sup> (Domenech *et al.*, 2011). En este sentido, es importante tener en cuenta que se ha propuesto que el alelo Ply está más asociado al secuencitipo de los aislados de neumococo que al serotipo (Jefferies *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando se analizaron los diferentes fondos genéticos y serotipos estudiados, se

observó que los alelos Ply<sub>1</sub> y Ply<sub>2</sub> eran más frecuentes que el resto. La actividad específica descrita para estos alelos es, junto con las actividades de los alelos 9 y 11, de las más altas, siendo de alrededor de  $4 \times 10^5$  HU mg<sup>-1</sup> (Jefferies *et al.*, 2007). Cabe destacar que el alelo Ply nombrado como alelo 22 estuvo presente en los 4 aislados del ST433<sup>22F</sup>, lo que podría apoyar la asociación descrita por Jefferies y cols. (2010) entre el ST y el alelo de Ply, así como su observación de que los alelos 1 y 2 podrían ser los más ampliamente distribuidos. Además, en este estudio afirmaban que la distribución de Ply entre los distintos ST de *S. pneumoniae* y los alelos Ply presentes en las cepas de portadores sanos eran similares a los observados entre los aislados de ENI. Nuestros resultados demuestran que, no sólo es similar entre aislados de portadores sanos y entre los aislados procedentes de ENI, sino que también son similares a los presentados por los aislados de neumococo procedentes de EAEPOC.

El estudio de LytA mostró la existencia de dos alelos mayoritarios entre los aislados estudiados, LytA<sub>2</sub> y LytA<sub>5</sub>. Además, el análisis sugiere que podría existir una relación entre el serotipo y el alelo LytA presente (Tabla 11). El alelo 15 estuvo presente en los aislados de serotipo 31, el alelo 8 en 4 aislados de serotipo 3 y el alelo 15 en los aislados de serotipo 31. Sin embargo, en relación a la hipótesis planteada de una mayor actividad de la proteína, no se ha encontrado una asociación evidente entre la actividad específica descrita para cada alelo (Morales *et al.*, 2015) con el alelo LytA presente en los aislados EPOC o cepas tipo EPOC, en comparación con los aislados procedentes de ENI. Cabe destacar, no obstante, que la actividad específica descrita para LytA hace referencia a la actividad de la proteína medida mediante la degradación de la pared celular y no a la actividad en la evasión de la respuesta inmune, que es a lo que se refieren nuestros resultados.

La estructura de Pce está determinada por tres factores principales: 1) un pequeño *linker* que contiene un doble núcleo de Zn<sup>2+</sup> en la superficie del centro activo, 2) la presencia de un largo bucle en el sitio catalítico, que interacciona de manera importante con las primeras tres unidades de las repeticiones del dominio de unión a colina, y 3) dos iones de Ca<sup>2+</sup> con función estructural que refuerzan la conformación del bucle (Pérez-Dorado *et al.*, 2012). El análisis comparativo de la secuencia de Pce entre los aislados secuenciados, ha demostrado que ninguno de los residuos descritos como parte del centro activo o que poseen una función relevante en la unión al Zn<sup>2+</sup> o al Ca<sup>2+</sup>, se encuentran afectados (Anexo I). Sin embargo, este estudio ha revelado la existencia de un gran polimorfismo en la secuencia de la proteína (que no había sido descrito anteriormente y que requerirá un estudio en mayor profundidad) (Tabla 10 y Anexo I), así como la necesidad de purificar la enzima para poder determinar la actividad específica de los diferentes alelos de la proteína. Resulta relevante el hecho de que se hayan encontrado variantes truncadas de una proteína que desempeña un papel crucial en la virulencia de neumococo (Hergott *et al.*, 2015; Hermoso *et al.*, 2005), por varios motivos. En primer lugar, porque sería la primera vez, hasta donde llega nuestro conocimiento, que se describe la existencia de aislados naturales mutantes en un factor de virulencia fundamental para la bacteria y, en segundo lugar, debido a que estos alelos se encontraron en 7 aislados de neumococo procedentes de pacientes con EPOC, lo que implicaría, dado el papel de Pce liberando residuos de PCho, que estos aislados presentasen mayores niveles de este aminoalcohol en la superficie celular bacteriana. No obstante, las secuencias de los alelos, así como el contenido en PCho de estos aislados deberán ser

corroborados mediante futuros experimentos. Por otro lado, la existencia de un aislado con una delección en una repetición completa del motivo de unión a colina (Anexo I) sugiere que podría afectar a la actividad de Pce, lo que resalta la importancia de ensayos que prueben la actividad enzimática de la proteína purificada. Estos resultados introducen un nuevo escenario sobre Pce que requerirá de un estudio posterior y en profundidad.

Teniendo en cuenta los resultados derivados de la secuenciación del genoma completo de los aislados de neumococo de EPOC, ENI y cepas tipo EPOC, y la actividad enzimática descrita, en el caso de los diferentes alelos de LytA, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral no muestran evidencias que permitan afirmar que las proteínas LytA y Pce de neumococo puedan participar en la mayor capacidad de los aislados EPOC y tipo EPOC para evadir el sistema inmune del hospedador, modulando el contenido de PCho en la envoltura bacteriana, como parecían indicar los ensayos *in vitro* con cepas mutantes en *pce* y *lytA*.

En el metabolismo, expresión y modulación del contenido de PCho en la superficie celular bacteriana intervienen muchos más genes de los mencionados y que deberán ser también analizados detalladamente más adelante. Entre ellos, destacan los genes de neumococo implicados en el metabolismo de la colina y de los TA que se encuentran agrupados en el locus *lic*, el cual está compuesto por, al menos, dos operones (*lic1* y *lic2*) que se transcriben de manera divergente (Kharat y Tomasz, 2006) (véase la Introducción de esta Memoria). Estos operones y las secuencias de las diferentes proteínas codificadas por la gran variedad de genes implicados en el proceso deberán ser estudiados en detalle con el fin de esclarecer, con el mayor detalle posible, las bases moleculares implicadas en la disminución del contenido de PCho en los aislados crónicos de neumococo. El hecho de que neumococo modifique su estructura para evadir el sistema inmune se ha observado también en otros patógenos responsables de las exacerbaciones agudas que sufren estos pacientes. Se ha demostrado en cepas de NTHi que la modificación del lipooligosacárido incrementa la resistencia a la actividad bactericida del suero (Markiewski y Lambris, 2007).

En conjunto, los resultados obtenidos podrían apoyar la idea de que la preferencia de *S. pneumoniae* para producir ENI o persistencia pulmonar esté asociada al fondo genético bacteriano y a la expresión del mismo, en vez de estar ligada a la presencia o ausencia de ciertos factores de virulencia o a alelos específicos de los mismos (Jefferies *et al.*, 2010). El HT podría afectar a varios genes o producir pequeños cambios en sus productos que pueden estar afectando conjuntamente, de un modo aditivo o sinérgico, dando lugar al fenotipo de cronicidad pulmonar. Asimismo, un aspecto que requerirá estudios posteriores es la posibilidad de cambios epigenéticos en genes importantes y que han sido descritos recientemente también en neumococo (Li *et al.*, 2016).

#### **4. ESTUDIOS GWA Y FILOGENÉTICO DE LOS AISLADOS DE NEUMOCOCO EXPUESTOS O NO A EHT**

El estudio de asociación del genoma completo (GWA) permite relacionar la existencia de polimorfismos de un solo nucleótido con rasgos característicos de las enfermedades. La comparación de los datos genéticos obtenidos de la secuenciación de los genomas de diferentes aislados de neumococo, expuestos o no al HT, no ha permitido hallar SNPs o INDELS que

expliquen el fenotipo de cronicidad pulmonar de los aislados de *S. pneumoniae* obtenidos de pacientes con EPOC. Tampoco ha permitido encontrar una asociación clara entre la exposición a HT de aislados procedentes de ENI y mutaciones compartidas entre las cepas tipo EPOC — derivadas de dicha exposición— y los aislados procedentes de EAEPOC que permitan explicar el fenotipo y, por tanto, concluir qué cambios a nivel génico favorecen la disminución del contenido en PCho y la evasión del sistema inmune. El GWA ha revelado posibles genes candidatos a estar alterados por el efecto del HT que deberían tenerse en cuenta para futuros análisis. Para encontrar posibles cambios comunes en los aislados procedentes de pacientes con EPOC no presentes en los diferentes fondos genéticos y serotipos de aislados invasivos, se incluyeron aislados con el mismo fondo genético procedentes de pacientes con ENI o de portadores sanos recibidos en el Laboratorio de Referencia de Neumococo de Southampton (Inglaterra). A pesar de haber ajustado el valor  $p$ -Fisher, el gráfico Q-Q reveló la existencia de un incremento significativo de los valores  $P$  por encima de lo esperado; por lo tanto, los genes posiblemente afectados por el HT se podrán tener en cuenta, siempre y cuando sean contrastados con análisis alternativos que permitan comprobar el efecto del HT sobre los mismos, así como la implicación de estos genes en el proceso biológico y patogénesis de neumococo en la EPOC.

Como ya se ha comentado anteriormente en esta Memoria, se ha descrito la existencia de ciertos serotipos que están más frecuentemente asociados a procesos de exacerbaciones agudas en pacientes con EPOC, como ocurre con algunos genotipos como el ST30<sup>16F</sup> (Domenech *et al.*, 2011). Resulta importante recordar que aislados con el mismo ST pueden presentar notables diferencias a nivel genético; por ejemplo, pueden presentar diferente serotipo como resultado de eventos de recombinación en el locus capsular (Coffey *et al.*, 1998). En relación a este hecho y corroborando lo descrito por Domenech y cols. (2011), en esta Tesis, los resultados derivados del filograma poblacional de aislados procedentes de EPOC frente a aislados responsables de ENI y obtenidos de portadores sanos de pacientes de Southampton (disponible en <https://microreact.org/project/HJNGagaD>), sugieren la existencia de una posible asociación entre el serotipo de *S. pneumoniae* y los procesos de EA que son frecuentes en los pacientes con EPOC. Sin embargo, no se ha encontrado esa misma relación con el ST. No obstante, hay que señalar que los STs que se agrupan dentro del mismo nodo, siendo del mismo serotipo, pueden aparecer distanciados en el árbol. En concreto, se observaron dos linajes diferentes del serotipo 11A, apoyando la hipótesis de que el serotipo es más importante en EPOC que el fondo genético donde se exprese. Sin embargo, el serotipo 16F se encontró en un único linaje, dificultando la afirmación de la existencia de una relación de EPOC con el serotipo o el fondo genético en *S. pneumoniae*.

## **VI. CONCLUSIONES**



1. Existe un aumento de casos de enfermedad neumocócica invasiva producida por aislados clínicos del serotipo 11A. La caracterización molecular de estos aislados ha revelado la existencia de tres secuencitipos diferentes: el ST62, susceptible a  $\beta$ -lactámicos, y los ST838 y ST6521, que presentan altos niveles de resistencia a dichos antibióticos.
2. Los aislados ST838<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> son variantes cercanas del clon Spain<sup>9V</sup>-ST156. El ST838<sup>11A</sup> surgió como consecuencia de un cambio en el gen *ddl* del MLST y la adquisición de un nuevo serotipo capsular, confiriéndole al serotipo 11A altos niveles de resistencia a penicilina y amoxicilina. Una mutación adicional en el gen *aroE* dio lugar a la aparición del ST6521<sup>11A</sup> manteniendo los altos niveles de resistencia antibiótica a  $\beta$ -lactámicos.
3. Las cepas pertenecientes a los ST62<sup>11A</sup> y ST6521<sup>11A</sup> presentaron una mayor capacidad para reclutar C4BP y evadir la fagocitosis dependiente de la inmunidad del complemento, que los aislados del ST838<sup>11A</sup>, lo que explica la mayor prevalencia de estos secuencitipos dentro de los aislados invasivos del serotipo 11A.
4. La mutación de una histidina por una tirosina en la posición 166 de la proteína LytA de los aislados del ST62<sup>11A</sup> es responsable de la mayor actividad evasora del sistema inmune por este secuencitipo y explica la elevada prevalencia de estos aislados en los últimos años. Sin embargo, la mayor capacidad para formar biofilmes, los altos niveles de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y el fenotipo intermedio de resistencia al sistema inmunitario, podrían favorecer la diseminación del ST6521<sup>11A</sup> como genotipo predominante en los próximos años.
5. Los aislados clínicos de *S. pneumoniae* procedentes de pacientes con EPOC, así como las cepas tipo EPOC, presentan niveles reducidos de fosforilcolina en su superficie. Como consecuencia de ello, estos aislados son reconocidos de un modo menos eficaz por la proteína C-reactiva y el componente C3b, evitando mejor la opsonofagocitosis.
6. La exposición de neutrófilos humanos al efecto del humo de tabaco reduce la expresión de los receptores Fc $\gamma$  y PSGL-1, implicados en el reconocimiento y fagocitosis de neumococo, y conduce a la disminución de la eliminación bacteriana por estas células. Los bajos niveles de PSGL-1 se asociaron a una mayor expresión de la metaloproteasa ADAM8 que actúa degradando este receptor en las células fagocitarias.
7. Las células del epitelio pulmonar incrementan la expresión de los receptores TLR4 y PAFr cuando son expuestas al efecto del tabaco. Esto es importante para el proceso infeccioso, ya que estos receptores desempeñan un papel crucial en el reconocimiento e interacción con patógenos respiratorios como *S. pneumoniae*.
8. Los aislados clínicos de pacientes con EPOC presentan mayores niveles de adhesión al epitelio pulmonar que los aislados procedentes de pacientes con ENI. Además, la exposición celular al efecto del humo de tabaco incrementa la adhesión de *S. pneumoniae* al epitelio pulmonar.

## CONCLUSIONES

9. La mayor invasión a células pulmonares expuestas a humo de tabaco por parte de los aislados procedentes de pacientes con enfermedad neumocócica invasiva está relacionada con el mayor contenido en fosforilcolina presente en la superficie bacteriana de estos, en comparación a los aislados de EPOC y tipo EPOC. El proceso invasivo está mediado por la interacción de la fosforilcolina con el receptor del PAF.
10. La exposición al humo de tabaco tanto de neumococo como de ratones favorece el desarrollo de un fenotipo persistente de infección pulmonar, que podría explicar por qué los pacientes con EPOC presentan neumonías neumocócicas recurrentes causadas, en muchos casos, por reinfecciones de la misma cepa.
11. La administración de los corticoides dexametasona o fluticasona podría ser beneficiosa para los pacientes con EPOC, ya que dificultan la capacidad de neumococo para adherir e invadir el epitelio respiratorio
12. El análisis genómico de las proteínas LytA, Pce y Ply procedentes de aislados de EPOC, ENI y cepas tipo EPOC sugiere que los cambios producidos por el HT no afectan, al menos directamente, a la actividad específica descrita para estas proteínas con relación a su actividad funcional. Además, se ha confirmado que la proteína Pce presenta un gran polimorfismo, que no había sido descrito anteriormente.

## **VII. CONCLUSIONS**



1. There is an increase in the cases of invasive pneumococcal disease caused by clinical isolates of serotype 11A. Molecular characterization of these isolates demonstrated the existence of three different sequence types: ST62<sup>11A</sup> susceptible to  $\beta$ -lactams, and the ST838<sup>11A</sup> and ST6521<sup>11A</sup> that harbour high levels of resistance to these antibiotics.
2. Isolates of ST838<sup>11A</sup> and ST6521<sup>11A</sup> are closely related variants to the Spain<sup>9V</sup>-ST156 clon. The ST838<sup>11A</sup> emerged from a single locus variant of the MLST in the *ddl* gene of ST156<sup>9V</sup>, harboring high levels of antibiotic resistance to amoxicillin and penicillin, including the acquisition of a new capsular serotype. An additional mutation in the *aroE* gene, led to the appearance of ST6521<sup>11A</sup>, maintaining the high resistance levels to  $\beta$ -lactams.
3. Strains belonging to ST62<sup>11A</sup> and ST6521<sup>11A</sup> showed a major ability to avoid complement-mediated phagocytosis than isolates of ST838<sup>11A</sup>, which explains the prevalence of these sequence types among the invasive isolates of serotype 11A.
4. A mutation of an histidine by a tyrosine in position 166 of the LytA protein of ST62<sup>11A</sup> isolates, which increases its activity diverting the host immune response, could explain the high prevalence of these isolates in the last years. However, the marked capacity of biofilm formation, together with the high levels of  $\beta$ -lactams resistance and the intermediate phenotype avoiding the immune response, may lead to the emergence of ST6521<sup>11A</sup> as the predominant genotype in the next few years.
5. *S. pneumoniae* clinical isolates from patients with COPD as well as COPD-like strains have reduced levels of phosphorylcholine in the bacterial surface. As a consequence, these isolates are less efficiently recognized by C-reactive protein and the C3b component, increasing the evasion of opsonophagocytosis.
6. Exposure of human neutrophils to the effect of cigarette smoke impairs the phagocytosis by reducing the expression of certain receptors involved in the recognition and clearance of *S. pneumoniae* such as Fc $\gamma$  and PSGL-1. The impaired levels of PSGL-1 were associated to an increased expression of the metalloprotease ADAM8 that cleaves this receptor in leukocytes.
7. Lung epithelial cells increase the expression of TLR4 and PAFr after exposure to cigarette smoke. This is important for the infectious processes because these receptors play a critical role in the interaction with respiratory pathogens like *S. pneumoniae*.
8. Clinical isolates from COPD have increased adhesion levels to lung epithelial cells in comparison to IPD isolates. Moreover, the exposure of lung cells to cigarette smoke increases the pneumococcal adhesion to the lung epithelium contributing to the persistent phenotype.
9. In lung cells exposed to cigarette smoke, the greater invasion by IPD isolates is related to the increased levels of phosphorylcholine on the bacterial surface of these strains, in comparison to COPD isolates and COPD-like strains. This effect triggers the internalization through the PAFr.

## CONCLUSIONS

10. Exposure to cigarette smoke contributes to the development of a persistent phenotype of lung infection in mice which might explain why COPD patients usually develop recurrent episodes of pneumococcal pneumonia caused, in many cases, by the same strain.
11. Administration of the corticoids dexamethasone and fluticasone impairs the pneumococcal capacity to adhere and invade the respiratory tract, which may be a beneficial treatment for COPD patients.
12. Genomic analysis of LytA, Pce and Ply from COPD, IPD and COPD-like strains suggest that changes induced by cigarette smoke do not affect, at least directly, to the specific protein activity described. In addition, our results confirmed that Pce is a pneumococcal protein with a marked polymorphism that had not been described before.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA



- Aaberge, I.S., Eng, J., Lemark, G., y Lovik, M. (1995). Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microb Pathog.* **18**: 141-152.
- Aanensen, D.M., y Spratt, B.G. (2005). The multilocus sequence typing network: mlst.net. *Nucleic Acids Res.* **33**: W728-W733.
- Agarwal, V., Kuchipudi, A., Fulde, M., Riesbeck, K., Bergmann, S. y Blom, A.M. (2013) *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. *J. Biol. Chem.* **288**: 6849–6863
- Agarwal, V., Sroka, M., Fulde, M., Bergmann, S., Riesbeck, K., y Blom, A.M. (2014). Binding of *Streptococcus pneumoniae* endopeptidase O (PepO) to complement component C1q modulates the complement attack and promotes host cell adherence. *J Biol Chem.* **289**: 15833-15844.
- Albert, D.H., Malo, P.E., Tapang, P., Shaughnessy, T.K., Morgan, D.W., Wegner, C.D., Curtin, M.L., Sheppard, G.S., Xu, L., Davidsen, S.K., *et al.* (1998). The role of platelet-activating factor (PAF) and the efficacy of ABT-491, a highly potent and selective PAF antagonist, in experimental allergic rhinitis. *J Pharmacol Exp Ther.* **284**: 83-88.
- Alberts, B., Johnson, A., y Lewis, J. (2002). The Adaptive Immune System. In *Molecular Biology of the Cell* (New York: Garland Science.).
- Albiger, B., Dahlberg, S., Sandgren, A., Wartha, F., Beiter, K., Katsuragi, H., Akira, S., Normark, S., y Henriques-Normark, B. (2007). Toll-like receptor 9 acts at an early stage in host defence against pneumococcal infection. *Cell Microbiol.* **9**: 633-644.
- Ali, Y.M., Lynch, N.J., Haleem, K.S., Fujita, T., Endo, Y., Hansen, S., Holmskov, U., Takahashi, K., Stahl, G.L., Dudler, T., *et al.* (2012). The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog.* **8**: e1002793.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* **215**: 403-410.
- Amara, U., Rittirsch, D., Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J.D., y Huber-Lang, M. (2008). Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol.* **632**: 71-79.
- American Academy of Pediatrics – Committee on Infectious Diseases. (2000). Policy statement: recommendations for the prevention of pneumococcal infections, including the use of pneumococcal conjugate *Vaccine.* (Prevnar), pneumococcal polysaccharide *Vaccine.*, and antibiotic prophylaxis. *Pediatrics.* **106**: 362-366.
- 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.
- Angel, C.S., Ruzek, M., y Hostetter, M.K. (1994). Degradation of C3 by *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis.* **170**: 600-608.
- Ardanuy, C., de la Campa, A.G., García, E., Fenoll, A., Calatayud, L., Cercenado, E., Pérez-Trallero, E., Bouza, E., y Liñares, J. (2014). Spread of *Streptococcus pneumoniae* serotype 8-ST63 multidrug-resistant recombinant Clone, Spain. *Emerg Infect Dis.* **20**: 1848-1856.
- Ardanuy, C., Tubau, F., Pallarés, R., Calatayud, L., Dominguez, M.A., Rolo, D., Grau, I., Martín, R., y Liñares, J. (2009). Epidemiology of invasive pneumococcal disease among adult patients in barcelona before and after pediatric 7-valent pneumococcal conjugate *Vaccine.* introduction, 1997–2007. *Clin Infect Dis.* **48**: 57-64.
- Arredouani, M., Yang, Z., Ning, Y., Qin, G., Soininen, R., Tryggvason, K., y Kobzik, L. (2004). The scavenger receptor MARCO is required for lung defense against pneumococcal pneumonia and inhaled particles. *J Exp Med.* **200**: 267-272.
- Asano, M., y Komiyama, K. (2011). Polymeric immunoglobulin receptor. *J Oral Sci.* **53**: 147-156.
- Assefa, S., Keane, T.M., Otto, T.D., Newbold, C., y Berriman, M. (2009). ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. *Bioinformatics.* **25**: 1968-1969.
- Attali, C., Durmort, C., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2008a) The interaction of *Streptococcus pneumoniae* with plasmin mediates transmigration across endothelial and epithelial monolayers by intercellular junction cleavage. *Infect. Immun.* **76**: 5350–5356.
- Attali, C., Frolet, C., Durmort, C., Offant, J., Vernet, T. y Di Guilmi, A.M. (2008b) *Streptococcus pneumoniae* choline-binding protein E interaction with plasminogen/plasmin stimulates migration across the extracellular matrix. *Infect. Immun.* **76**: 466–476.
- Austrian, R. (1981). Pneumococcus: the first one hundred years. *Rev Infect Dis.* **3**: 183-189.
- Austrian, R. (1986). Untreated pneumococcal bacteraemia of cryptic origin in the human adult with spontaneous recovery. *S Afr Med J. Suppl:* 46-49.
- 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.
- Avery, O.T., y Cullen, G.E. (1923). Studies on the enzymes of pneumococcus. IV. Bacteriolytic enzyme. *J Exp Med.* **38**: 199-206.
- Ayala, A.E. (2016) Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y alimentación. *Farmacia profesional.* **30**: 26-9.

- Bagaitkar, J., Demuth, D.R., Daep, C.A., Renaud, D.E., Pierce, D.L., y Scott, D.A. (2010). Tobacco upregulates *P. gingivalis* fimbrial proteins which induce TLR2 hyposensitivity. *PLoS One*. **5**: e9323.
- Bagaitkar, J., Williams, L.R., Renaud, D.E., Bemakanakere, M.R., Martín, M., Scott, D.A., y Demuth, D.R. (2009). Tobacco-induced alterations to *Porphyromonas gingivalis*-host interactions. *Environ Microbiol*. **11**: 1242-1253.
- Bagnoli, F., Moschioni, M., Donati, C., Dimitrovska, V., Ferlenghi, I., Facciotti, C., Muzzi, A., Giusti, F., Emolo, C., Sinisi, A., 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.
- Bajic, G., Degn, S.E., Thiel, S., y Andersen, G.R. (2015). Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J*. **34**: 2735-2757.
- 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.
- Barbier, M., Agusti, A., y Alberti, S. (2008). Fluticasone propionate reduces bacterial airway epithelial invasion. *Eur Resp J*. **32**: 1283-1288.
- Barnard, J.P., y Stinson, M.W. (1996). The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infect Immun*. **64**: 3853-3857.
- Barnes, P.J. (2004a). Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell Mol Biol. (Noisy-le-grand)* **50** Online Pub: OL627-O637.
- Barnes, P.J. (2004b). Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* **56**: 515-548.
- Baur, S., Marles-Wright, J., Buckenmaier, S., Lewis, R.J., y Vollmer, W. (2009). Synthesis of CDP-activated ribitol for teichoic acid precursors in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. **191**: 1200-1210.
- Benton, K.A., Paton, J.C., y Briles, D.E. (1997). Differences in virulence for mice among *Streptococcus pneumoniae* strains of capsular types 2, 3, 4, 5, and 6 are not attributable to differences in pneumolysin production. *Infect Immun*. **65**: 1237-1244.
- Bergmann, S., Lang, A., Rohde, M., Agarwal, V., Rennemeier, C., Grashoff, C., Preissner, K.T., y Hammerschmidt, S. (2009). Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J Cell Sci*. **122**: 256-267.
- Bergmann, S., y Hammerschmidt, S. (2006). Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*. **152**: 295-303.
- 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.
- Berry, A.M., Yother, J., Briles, D.E., Hansman, D., y Paton, J.C. (1989). Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. **57**: 2037-2042.
- Bharadwaj, D., Mold, C., Markham, E., y Du Clos, T.W. (2001). Serum amyloid P component binds to Fc $\gamma$  receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol*. **166**: 6735-6741.
- Bhowmik, A., Seemungal, T.A., Sapsford, R.J., y Wedzicha, J.A. (2000). Relation of sputum inflammatory markers to symptoms and lung function changes in COPD exacerbations. *Thorax*. **55**: 114-120.
- Blom, A.M., Kask, L., y Dahlback, B. (2003). CCP1-4 of the C4b-binding protein alpha-chain are required for factor I mediated cleavage of complement factor C3b. *Molecular immunology*. **39**: 547-556.
- Boetzer, M., Henkel, C.V., Jansen, H.J., Butler, D., y Pirovano, W. (2011). Scaffolding pre-assembled contigs using SSPACE. *Bioinformatics*. **27**: 578-579.
- Boetzer, M., y Pirovano, W. (2012). Toward almost closed genomes with GapFiller. *Genome Biol*. **13**: R56.
- Bogaert, D., De Groot, R., y Hermans, P.W. (2004). *Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*. **4**: 144-154.
- Botelho, R.J., y Grinstein, S. (2011). Phagocytosis. *Curr Biol* **21**: R533-R538.
- Bozlu, G., Atici, A., Turhan, A.H., Polat, A., Nayci, A., Okuyaz, C., y Taskinar, H. (2007). Platelet-activating factor antagonist (ABT-491) decreases neuronal apoptosis in neonatal rat model of hypoxic ischemic brain injury. *Brain Res*. **1143**: 193-198.
- Bratcher, P.E., Kim, K.H., Kang, J.H., Hong, J.Y., y Nahm, M.H. (2010). Identification of natural pneumococcal isolates expressing serotype 6D by genetic, biochemical and serological characterization. *Microbiology*. **156**: 555-560.
- Braun, J.S., Sublett, J.E., Freyer, D., Mitchell, T.J., Cleveland, J.L., Tuomanen, E.I., y Weber, J.R. (2002). Pneumococcal pneumolysin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest*. **109**: 19-27.
- Briles, D.E., Crain, M.J., Gray, B.M., Forman, C., y Yother, J. (1992). Strong association between capsular type and virulence for mice among human isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. **60**: 111-116.

- Briles, D.E., Hollingshead, S.K., Swiatlo, E., Brooks-Walter, A., Szalai, A., Virolainen, A., McDaniel, L.S., Benton, K.A., White, P., Prellner, K., *et al.* (1997). PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal *Vaccine.s*. *Microb Drug Resist*. **3**: 401-408.
- Briles, E.B., y Tomasz, A. (1973). Pneumococcal Forssman antigen. A choline-containing lipoteichoic acid. *J Biol Chem*. **248**: 6394-6397.
- Brook, I., y Gober, A.E. (2005a). Recovery of potential pathogens and interfering bacteria in the nasopharynx of otitis media-prone children and their smoking and nonsmoking parents. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **131**: 509-512.
- Brook, I., y Gober, A.E. (2005b). Recovery of potential pathogens and interfering bacteria in the nasopharynx of smokers and nonsmokers. *Chest*. **127**: 2072-2075.
- Brooks-Walter, A., Briles, D.E., y Hollingshead, S.K. (1999). The *pspC* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a polymorphic protein, PspC, which elicits cross-reactive antibodies to PspA and provides immunity to pneumococcal bacteremia. *Infect Immun*. **67**: 6533-6542.
- Brouwer, M.C., de Gans, J., Heckenberg, S.G., 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.
- Brouwer, M.C., McIntyre, P., Prasad, K., y van de Beek, D. (2013). Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev* **6**: CD004405.
- Brown, J.S., Hussell, T., Gilliland, S.M., Holden, D.W., Paton, J.C., Ehrenstein, M.R., Walport, M.J., y Botto, M. (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.
- Brueggemann, A.B., Pai, R., Crook, D.W., y Beall, B. (2007). *Vaccine*. escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog*. **3**: e168.
- Brueggemann, A.B., y Spratt, B.G. (2003). Geographic distribution and clonal diversity of *Streptococcus pneumoniae* serotype 1 isolates. *J Clin Microbiol*. **41**: 4966-4970.
- Brundish, D.E., y Baddiley, J. (1968). Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochem J* **110**: 573-582.
- Brzin, B. (1969). Reversion of  $\alpha$ - into  $\beta$ -hemolysis of *Diplococcus pneumoniae* by low concentration of optochin. *Experientia* **25**: 985-986.
- Buey, R.M., Monterroso, B., Menéndez, M., Diakun, G., Chacón, P., Hermoso, J.A., y Díaz, J.F. (2007). Insights into molecular plasticity of choline binding proteins (pneumococcal surface proteins) by SAXS. *J Mol Biol*. **365**: 411-424.
- Bullard, D.C., Kunkel, E.J., Kubo, H., Hicks, M.J., Lorenzo, I., Doyle, N.A., Doerschuk, C.M., Ley, K., y Beaudet, A.L. (1996). Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *J Exp Med*. **183**: 2329-2336.
- Burge, P.S., Calverley, P.M., Jones, P.W., Spencer, S., Anderson, J.A., y Maslen, T.K. (2000). Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial. *BMJ* **320**: 1297-1303.
- 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.
- Calix, J.J., Porambo, R.J., Brady, A.M., Larson, T.R., Yother, J., Abeygunwardana, C., y Nahm, M.H. (2012). Biochemical, genetic, and serological characterization of two capsule subtypes among *Streptococcus pneumoniae* Serotype 20 strains: discovery of a new pneumococcal serotype. *J Biol Chem*. **287**: 27885-27894.
- 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.
- Calverley, P., Pauwels, R., Vestbo, J., Jones, P., Pride, N., Gulsvik, A., *et al.* (2003). Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: a randomised controlled trial. *Lancet*. **361**: 449-456.
- Calverley, P.M., Anderson, J.A., Celli, B., Ferguson, G.T., Jenkins, C., Jones, P.W., Yates, J.C., Vestbo, J. (2007). Salmeterol and fluticasone propionate and survival in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. **356**: 775-789.
- Camilli, R., Del Grosso, M., Iannelli, F., y Pantosti, A. (2008). New genetic element carrying the erythromycin resistance determinant *erm*(TR) in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. **52**: 619-625.
- Campins Martí, M. (2015). [Pneumococcal *Vaccine.s*. New conjugate *Vaccine.s* for adults]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **33**: 617-624.
- Carver, T.J., Rutherford, K.M., Berriman, M., Rajandream, M.A., Barrell, B.G., y Parkhill, J. (2005). ACT: the Artemis Comparison Tool. *Bioinformatics*. **21**: 3422-3423.
- CDC, ACIP (1997). Prevention of pneumococcal disease: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **46**: 1-24.
- Chhatwal, G.S., Preissner, K.T., Muller-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.
- Chiavolini, D., Pozzi, G., y Ricci, S. (2008). Animal models of *Streptococcus pneumoniae* disease. *Clin Microbiol Rev.* **21**: 666-685.

- Chin, C.L., Manzel, L.J., Lehman, E.E., Humlicek, A.L., Shi, L., Starner, T.D., Denning, G.M., Murphy, T.F., Sethi, S., y Look, D.C. (2005). *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med.* **172**: 85-91.
- Clark, S.E., y Weiser, J.N. (2013). Microbial modulation of host immunity with the small molecule phosphorylcholine. *Infect Immun.* **81**: 392-401.
- Clarke, T.B., Francella, N., Huegel, A., y Weiser, J.N. (2011). Invasive bacterial pathogens exploit TLR-mediated downregulation of tight junction components to facilitate translocation across the epithelium. *Cell Host Microbe* **9**: 404-414.
- Clarke, V.A., Platt, N., y Butters, T.D. (1995). Cloning and expression of the  $\beta$ -*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.
- Coen, P.G., Tully, J., Stuart, J.M., Ashby, D., Viner, R.M., y Booy, R. (2006). Is it exposure to cigarette smoke or to smokers which increases the risk of meningococcal disease in teenagers? *Int J Epidemiol* **35**: 330-336.
- Coffey, T.J., Daniels, M., McDougal, L.K., Dowson, C.G., Tenover, F.C., y Spratt, B.G. (1995). Genetic analysis of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* **39**: 1306-1313.
- Coffey, T.J., Dowson, C.G., Daniels, M., Zhou, J., Martín, C., Spratt, B.G., y Musser, J.M. (1991). Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **5**: 2255-2260.
- Coffey, T.J., Enright, M.C., Daniels, M., Morona, J.K., Morona, R., Hryniewicz, W., Paton, J.C., y Spratt, B.G. (1998). Recombinational exchanges at the capsular polysaccharide biosynthetic locus lead to frequent serotype changes among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **27**: 73-83.
- Cole, A.M., Liao, H.I., Stuchlik, O., Tilan, J., Pohl, J., y Ganz, T. (2002). Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *J Immunol.* **169**: 6985-6991.
- Coleman, J.R., Papamichail, D., Yano, M., García-Suarez Mdel, M., y Pirofski, L.A. (2011). Designed reduction of *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity via synthetic changes in virulence factor codon-pair bias. *J Infect Dis.* **203**: 1264-1273.
- Corsini, B., Aguinalalde, L., Ruiz, S., Domenech, M., Antequera, M.L., Fenoll, A., García, P., García, E., y Yuste, J. (2016). Immunization with LytB protein of *Streptococcus pneumoniae* activates complement-mediated phagocytosis and induces protection against pneumonia and sepsis. *Vaccine.* **34**: 6148-6157.
- Cosio, M.G., Saetta, M., y Agustí, A. (2009). Immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* **360**: 2445-2454.
- Cossart, P., y Sansonetti, P.J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science.* **304**: 242-248.
- Crisostomo, M.I., Vollmer, W., Kharat, A.S., Inhulsen, 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.
- Croucher, N.J., Walker, D., Romero, P., Lennard, N., Paterson, G.K., Bason, N.C., Mitchell, A.M., Quail, M.A., Andrew, P.W., Parkhill, J., et al. (2009). Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae* Spain<sup>23F</sup> ST81. *J Bacteriol.* **191**: 1480-1489.
- Crum, N.F., Barrozo, C.P., Chapman, F.A., Ryan, M.A., y Russell, K.L. (2004). An outbreak of conjunctivitis due to a novel unencapsulated *Streptococcus pneumoniae* among military trainees. *Clin Infect Dis.* **39**: 1148-1154.
- Cundell, D.R., Gerard, N.P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkilä, I., y Tuomanen, E.I. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature.* **377**: 435-438.
- Dahlgren, C., y Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol. Methods* **232**: 3-14.
- Dalia, A.B., 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.
- Damjanovic, M., Kharat, A.S., Eberhardt, A., Tomasz, A., y Vollmer, W. (2007). The essential *tacF* gene is responsible for the choline-dependent growth phenotype of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **189**: 7105-7111.
- Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M.K. y McDaniel, L.S. (2001) PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect. Immun.* **69**: 3435-3437.
- Davis, A.E., 3rd (1988). C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Annu Rev Immunol* **6**: 595-628.
- 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- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase. *J Bacteriol.* **184**: 4988-5000.

- Degn, S.E., Thiel, S., y Jensenius, J.C. (2013). Recombinant expression of the autocatalytic complement protease MASP-1 is crucially dependent on co-expression with its inhibitor, C1 inhibitor. *Protein Expr Purif.* **88**: 173-182.
- Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N., y Hanahan, D.J. (1979). Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem.* **254**: 9355-9358.
- Denapate, D., Bruckner, R., Hakenbeck, R., y Vollmer, W. (2012). Biosynthesis of teichoic acids in *Streptococcus pneumoniae* and closely related species: lessons from genomes. *Microb Drug Resist.* **18**: 344-358.
- Denapate, D., y Hakenbeck, R. (2011). A new variant of the capsule 3 cluster occurs in *Streptococcus pneumoniae* from deceased wild chimpanzees. *PLoS One.* **6**: e25119.
- Dessing, M.C., Hirst, R.A., de Vos, A.F., y van der Poll, T. (2009). Role of Toll-like receptors 2 and 4 in pulmonary inflammation and injury induced by pneumolysin in mice. *PLoS One.* **4**: e7993.
- Díaz, E., y García, J.L. (1990). Characterization of the transcription unit encoding the major pneumococcal autolysin. *Gene.* **90**: 157-162.
- Dieudonne-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.
- Domenech, A., Ardanuy, C., Balsalobre, L., Martí, S., Calatayud, L., De la Campa, A.G., Brueggemann, A.B., y Liñares, J. (2012). Pneumococci can persistently colonize adult patients with chronic respiratory disease. *J Clin Microbiol.* **50**: 4047-4053.
- Domenech, A., Ardanuy, C., Calatayud, L., Santos, S., Tubau, F., Grau, I., Verdager, R., Dorca, J., Pallarés, R., Martín, R., et al. (2011). Serotypes and genotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing pneumonia and acute exacerbations in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Antimicrob Chemother.* **66**: 487-493.
- Domenech, M., Araujo-Bazan, L., García, E., y Moscoso, M. (2014). In vitro biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* as a predictor of post-vaccination emerging serotypes colonizing the human nasopharynx. *Environ Microbiol.* **16**: 1193-1201.
- Domenech, M., Damián, D., Ardanuy, C., Liñares, J., Fenoll, A., y García, E. (2015). Emerging, non-PCV13 serotypes 11A and 35B of *Streptococcus pneumoniae* show high potential for biofilm formation *in vitro*. *PLoS One.* **10**: e0125636.
- Domenech, M., García, E., y Moscoso, M. (2009). Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. *Environ Microbiol.* **11**: 2542-2555.
- Domenech, M., García, E., y Moscoso, M. (2012). Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Biotechnol* **5**: 455-465.
- Domenech, M., Ramos-Sevillano, E., García, E., Moscoso, M., y Yuste, J. (2013). Biofilm formation avoids complement immunity and phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **81**: 2606-2615.
- Dominguez-Luis, M., Lamana, A., Vazquez, J., García-Navas, R., Mollinedo, F., Sánchez-Madrid, F., Díaz-Gonzalez, F., y Urzainqui, A. (2011). The metalloprotease ADAM8 is associated with and regulates the function of the adhesion receptor PSGL-1 through ERM proteins. *Eur J Immunol.* **41**: 3436-3442.
- Dominguez-Luis, M.J., Urzainqui-Mayayo, A., Herrera-García, A.M., Díaz-Martín, A., Arce-Franco, M.T., y Mollinedo, F. (2010). Role of the metalloproteinase ADAM-8 in the regulation of the inflammatory response. PSGL-1 shedding by ADAM-8 in human neutrophils. *Arthritis Rheum.* **62** Suppl 10 :1509.
- Donati, C., Hiller, N.L., Tettelin, H., Muzzi, A., Croucher, N.J., Angiuoli, S.V., Oggioni, M., Dunning Hotopp, J.C., Hu, F.Z., Riley, D.R., et al. (2010). Structure and dynamics of the pan-genome of *Streptococcus pneumoniae* and closely related species. *Genome Biol.* **11**: R107.
- Donlan, R.M., y Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* **15**: 167-193.
- Droemann, D., Goldmann, T., Tiedje, T., Zabel, P., Dalhoff, K., y Schaaf, B. (2005). Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res.* **6**: 68.
- Du, J., Yuan, Z., Ma, Z., Song, J., Xie, X., y Chen, Y. (2014). KEGG-PATH: Kyoto encyclopedia of genes and genomes-based pathway analysis using a path analysis model. *Mol Biosyst.* **10**: 2441-2447.
- Eberhardt, A., Hoyland, C.N., Vollmer, D., Bisle, S., Cleverley, R.M., Johnsborg, O., Håvarstein, L.S., Lewis, R.J., y Vollmer, W. (2012). Attachment of capsular polysaccharide to the cell wall in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* **18**: 240-255.
- Eberhardt, A., Wu, L.J., Errington, J., Vollmer, W., y Veening, J.W. (2009). Cellular localization of choline-utilization proteins in *Streptococcus pneumoniae* using novel fluorescent reporter systems. *Mol Microbiol.* **74**: 395-408.
- Eisen, D.P. (2010). Mannose-binding lectin deficiency and respiratory tract infection. *J Innate Immun* **2**: 114-122.
- El Ahmer, O.R., Essery, S.D., Saadi, A.T., Raza, M.W., Ogilvie, M.M., Weir, D.M., y Blackwell, C.C. (1999). The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **23**: 27-36.
- 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.
- Elm, C., Rohde, M., Vaerman, J.P., Chhatwal, G.S., y Hammerschmidt, S. (2004). Characterization of the interaction of the pneumococcal surface protein SpsA with the human polymeric immunoglobulin receptor (hplgR). *Indian J Med Res.* **119 Suppl**: 61-65.
- Endo, Y., Takahashi, M., Iwaki, D., Ishida, Y., Nakazawa, N., Kodama, T., Matsuzaka, T., Kanno, K., Liu, Y., Tsuchiya, K., et al. (2012). Mice deficient in ficolin, a lectin complement pathway recognition molecule, are susceptible to *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol.* **189**: 5860-5866.
- 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.
- Ernst, P., Gonzalez, A.V., Brassard, P., y Suissa, S. (2007). Inhaled corticosteroid use in chronic obstructive pulmonary disease and the risk of hospitalization for pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* **176**: 162-166.
- Etzioni, A. (2007). Leukocyte adhesion deficiencies: molecular basis, clinical findings, and therapeutic options. *Adv Exp Med Biol.* **601**: 51-60.
- Exley, R.M., Shaw, J., Mowe, E., Sun, Y.H., West, N.P., Williamson, M., Botto, M., Smith, H., y Tang, C.M. (2005). Available carbon source influences the resistance of *Neisseria meningitidis* against complement. *J Exp Med.* **201**: 1637-1645.
- Fainstein, V., Musher, D.M., y Cate, T.R. (1980). Bacterial adherence to pharyngeal cells during viral infection. *J Infect Dis.* **141**: 172-176.
- Fairn, G.D., y Grinstein, S. (2012). How nascent phagosomes mature to become phagolysosomes. *Trends Immunol.* **33**: 397-405.
- Falgarone, G., y Chiocchia, G. (2009). Clusterin: a multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity. *Adv Cancer Res.* **104**: 139-170.
- Fearon, D.T., Austen, K.F., y Ruddy, S. (1973). Formation of a hemolytically active cellular intermediate by the interaction between properdin factors B and D and the activated third component of complement. *J Exp Med.* **138**: 1305-1313.
- Feikin, D.R., Kagucia, E.W., Loo, J.D., Link-Gelles, R., Puhan, M.A., Cherian, T., Levine, O.S., Whitney, C.G., O'Brien, K.L., y Moore, M.R. (2013). Serotype-specific changes in invasive pneumococcal disease after pneumococcal conjugate *Vaccine*. introduction: a pooled analysis of multiple surveillance sites. *PLoS Med.* **10**: e1001517.
- Feldhaeuser, B., Platt, S.R., Marrache, S., Kolishetti, N., Pathak, R.K., Montgomery, D.J., Reno, L.R., Howerth, E., y Dhar, S. (2015). Evaluation of nanoparticle delivered cisplatin in beagles. *Nanoscale.* **7**: 13822-13830.
- 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.
- Feldman, C., Mitchell, T.J., Andrew, P.W., Boulnois, G.J., Read, R.C., Todd, H.C., Cole, P.J., y Wilson, R. (1990). The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium *in vitro*. *Microb Pathog.* **9**: 275-284.
- Fenoll, A., Aguilar, L., Gimenez, M.J., Vicioso, M.D., Robledo, O., Granizo, J.J., y Coronel, P. (2012). Variations in serotypes and susceptibility of adult non-invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates between the periods before (May 2000–May 2001) and 10 years after (May 2010–May 2011) introduction of conjugate *Vaccine*s for child immunisation in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* **40**: 18-23.
- Fenoll, A., Granizo, J.J., Aguilar, L., Gimenez, M.J., Aragoneses-Fenoll, L., Hanquet, G., Casal, J., y Tarragó, D. (2009). Temporal trends of invasive *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antimicrobial resistance patterns in Spain from 1979 to 2007. *J Clin Microbiol.* **47**: 1012-1020.
- Fenoll, A., Jado, I., Vicioso, D., y Casal, J. (1997). Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol.* **35**: 764-766.
- Fenoll, A., Martín Bourgon, C., Muñoz, R., Vicioso, D., y Casal, J. (1991). Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Spain, 1979–1989. *Rev Infect Dis.* **13**: 56-60.
- Fenoll, A., Muñoz, R., García, E., y de la Campa, A.G. (1994). Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F<sub>0</sub> complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H<sup>+</sup>-ATPases. *Mol Microbiol.* **12**: 587-598.
- Ferguson, G.T., Anzueto, A., Fei, R., Emmett, A., Knobil, K., y Kalberg, C. (2008). Effect of fluticasone propionate/salmeterol (250/50 µg) or salmeterol (50 µg) on COPD exacerbations. *Respir Med.* **102**: 1099-1108.
- 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.
- Ferreira, V.P., Pangburn, M.K., y Cortés, C. (2010). Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol.* **47**: 2187-2197.

- Finkelstein, R., Fraser, R.S., Ghezzi, H., y Cosio, M.G. (1995). Alveolar inflammation and its relation to emphysema in smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* **152**: 1666-1672.
- Fischer, W. (2000). Phosphocholine of pneumococcal teichoic acids: role in bacterial physiology and pneumococcal infection. *Res Microbiol.* **151**: 421-427.
- Fleck, R.A., Romero-Steiner, S., y Nahm, M.H. (2005). Use of HL-60 cell line to measure opsonic capacity of pneumococcal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol.* **12**: 19-27.
- Foronjy, R.F., Salathe, M.A., Dabo, A.J., Baumlin, N., Cummins, N., Eden, E., y Geraghty, P. (2016). TLR9 expression is required for the development of cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **311**: L154-166.
- Fraenkel, A. (1886). Weitere Beiträge zur Lehre von den Mikrokokken der genuinen fibrinösen Pneumonie. *Z Klin Med* **11**: 437-458.
- Frolet, C., Beniazza, M., Roux, L., Gallet, B., Noirclerc-Savoye, M., Vernet, T., y Di Guilmi, A.M. (2010). New adhesion functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiol.* **10**: 190.
- Garau, G., Lemaire, D., Vernet, T., Dideberg, O., y Di Guilmi, A.M. (2005). Crystal structure of phosphorylcholine esterase domain of the virulence factor choline-binding protein E from *Streptococcus pneumoniae*: new structural features among the metallo- $\beta$ -lactamase superfamily. *J Biol Chem.* **280**: 28591-28600.
- García, E., García, J.L., García, P., Arrarás, A., Sánchez-Puelles, J.M., y López, R. (1988). Molecular evolution of lytic enzymes of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* **85**: 914-918.
- García, E., García, J.L., Ronda, C., García, P., y López, R. (1985). Cloning and expression of the pneumococcal autolysin gene in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* **201**: 225-230.
- García, J.L., Díaz, E., Romero, A., y García, P. (1994). Carboxy-terminal deletion analysis of the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol.* **176**: 4066-4072.
- García, J.L., Sánchez-Beato, A.R., Medrano, F.J., y López, R. (2000). Versatility of choline-binding domain. En *Streptococcus pneumoniae* Molecular Biology & Mechanisms of Disease, A. Tomasz, ed. (Larchmont, NY: Mary Ann Liebert), pp. 231-244.
- García, P., González, M., García, E., García, J.L., y López, R. (1999b). The molecular characterization of the first autolytic lysozyme of *Streptococcus pneumoniae* reveals evolutionary mobile domains. *Mol Microbiol.* **33**: 128-138.
- García, P., González, M.P., García, E., López, R., y García, J.L. (1999a). LytB, a novel pneumococcal murein hydrolase essential for cell separation. *Mol Microbiol.* **31**: 1275-1281.
- García-Bustos, J.F., Chait, B.T., y Tomasz, A. (1988). Altered peptidoglycan structure in a pneumococcal transformant resistant to penicillin. *J Bacteriol.* **170**: 2143-2147.
- García-García, E., y Rosales, C. (2002). Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol.* **72**: 1092-1108.
- García-Laorden, M.I., Rodríguez de Castro, F., Sole-Violán, J., Payeras, A., Briones, M.L., Borderías, L., Aspa, J., Blanquer, J., Rajas, O., Marcos-Ramos, J.A., et al. (2013). The role of mannose-binding lectin in pneumococcal infection. *Eur Resp J.* **41**: 131-139.
- Garmendia, J., Martí-Lliteras, P., Molerés, J., Puig, C., y Bengoechea, J.A. (2012a). Genotypic and phenotypic diversity of the noncapsulated *Haemophilus influenzae*: adaptation and pathogenesis in the human airways. *Int Microbiol.* **15**: 159-172.
- Garmendia, J., Morey, P., y Bengoechea, J.A. (2012b). Impact of cigarette smoke exposure on host-bacterial pathogen interactions. *Eur Resp J.* **39**: 467-477.
- Garmendia, J., Viadas, C., Calatayud, L., Mell, J.C., Martí-Lliteras, P., Euba, B., Llobet, E., Gil, C., Bengoechea, J.A., Redfield, R.J., et al. (2014). Characterization of nontypable *Haemophilus influenzae* isolates recovered from adult patients with underlying chronic lung disease reveals genotypic and phenotypic traits associated with persistent infection. *PLoS One.* **9**: e97020.
- Garnacho-Montero, J., García-Cabrera, E., Jiménez-Álvarez, R., Díaz-Martín, A., Revuelto-Rey, J., Aznar-Martín, J., y Garnacho-Montero, C. (2012). Genetic variants of the MBL2 gene are associated with mortality in pneumococcal sepsis. *Diagn Microbiol Infect Dis* **73**: 39-44.
- Gasc, A.M., Kauc, L., Barraille, P., Sicard, M., y Goodgal, S. (1991). Gene localization, size, and physical map of the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* **173**: 7361-7367.
- Gilbert, R.J. (2010). Cholesterol-dependent cytolysins. *Adv Exp Med Biol.* **677**: 56-66.
- Gillespie, S.H., McHugh, T.D., Ayres, H., Dickens, A., Efstratiou, A., y Whiting, G.C. (1997). Allelic variation in *Streptococcus pneumoniae* autolysin (*N*-acetyl muramoyl-L-alanine amidase). *Infect Immun.* **65**: 3936-3938.
- Gingles, N.A., Alexander, J.E., Kadioglu, A., Andrew, P.W., Kerr, A., Mitchell, T.J., Hopes, E., Denny, P., Brown, S., Jones, H.B., et al. (2001). Role of genetic resistance in invasive pneumococcal infection: identification and study of susceptibility and resistance in inbred mouse strains. *Infect Immun.* **69**: 426-434.
- Gisch, N., Kohler, T., Ulmer, A.J., Muthing, J., Pribyl, T., Fischer, K., Lindner, B., Hammerschmidt, S., y Zahring, U. (2013). Structural reevaluation of *Streptococcus pneumoniae* lipoteichoic acid and new insights into its immunostimulatory potency. *J Biol Chem.* **288**: 15654-15667.

- Gisch, N., Peters, K., Zähringer, U., and Vollmer, W. (2015). The pneumococcal cell wall. En *Streptococcus pneumoniae. Molecular mechanisms of host-pathogen interactions.*, eds. J. Brown, S. Hammerschmidt & C. Orihuela. (San Diego, CA 92101-4495, USA: Elsevier, Inc.), pp.145-167.
- GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) (2016). Global Strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD. <http://goldcopd.org>.
- Golubchik, T., Brueggemann, A.B., Street, T., Gertz, R.E., Jr., Spencer, C.C., Ho, T., Giannoulitou, E., Link-Gelles, R., Harding, R.M., Beall, B., *et al.* (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a *Vaccine*. escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nat Genet.* **44**: 352-355.
- Golubchik, T., Brueggemann, A.B., Street, T., Gertz, R.E., Jr., Spencer, C.C., Ho, T., Giannoulitou, E., Link-Gelles, R., Harding, R.M., Beall, B., *et al.* (2012). Pneumococcal genome sequencing tracks a *Vaccine*. escape variant formed through a multi-fragment recombination event. *Nat Genet.* **44**: 352-355.
- Gompertz, S., O'Brien, C., Bayley, D.L., Hill, S.L., y Stockley, R.A. (2001). Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Resp J.* **17**: 1112-1119.
- 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.
- Gounder, P.P., Bruce, M.G., Bruden, D.J., Singleton, R.J., Rudolph, K., Hurlburt, D.A., Hennessy, T.W., y Wenger, J. (2014). Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate *Vaccine*. on nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*—Alaska, 2008–2012. *J Infect Dis.* **209**: 1251-1258.
- Gray, B.M., Converse, G.M., 3rd, y Dillon, H.C., Jr. (1980). Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. *J Infect Dis.* **142**: 923-933.
- Greenberg, D., Givon-Lavi, N., Broides, A., Blancovich, I., Peled, N., y Dagan, R. (2006). The contribution of smoking and exposure to tobacco smoke to *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* carriage in children and their mothers. *Clin Infect Dis.* **42**: 897-903.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond)* **27**: 113-159.
- Grigg, J. (2012). The platelet activating factor receptor: a new anti-infective target in respiratory disease? *Thorax.* **67**: 840-841.
- Grigg, J., Walters, H., Sohal, S.S., Wood-Baker, R., Reid, D.W., Xu, C.B., Edvinsson, L., Morissette, M.C., Stampfli, M.R., Kirwan, M., *et al.* (2012). Cigarette smoke and platelet-activating factor receptor dependent adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to lower airway cells. *Thorax.* **67**: 908-913.
- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B., y Claverys, J.P. (2005). Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**: 8710-8715.
- Gust, A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Gotz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G., *et al.* (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J Biol Chem.* **282**: 32338-32348.
- Haas, W., Hesje, C.K., Sanfilippo, C.M., y Morris, T.W. (2011). High proportion of nontypeable *Streptococcus pneumoniae* isolates among sporadic, nonoutbreak cases of bacterial conjunctivitis. *Curr Eye Res.* **36**: 1078-1085.
- Hakenbeck, R., Kaminski, K., König, A., van der Linden, M., Paik, J., Reichmann, P., y Zahner, D. (1999). Penicillin-binding proteins in  $\beta$ -lactam-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* **5**: 91-99.
- Hakenbeck, R., Madhour, A., Denapate, D., y Bruckner, R. (2009). Versatility of choline metabolism and choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* and commensal streptococci. *FEMS Microbiol Rev.* **33**: 572-586.
- Hall, L.M., Whitley, 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.
- Hamid, Q., Cosio, M., y Lim, S. (2004). Inflammation and remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol.* **114**: 1479-1481.
- 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., 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.
- Hanage, W.P., Kaijalainen, T.H., Syrjanen, R.K., Auranen, K., Leinonen, M., Makela, P.H., y Spratt, B.G. (2005). Invasiveness of serotypes and clones of *Streptococcus pneumoniae* among children in Finland. *Infect Immun.* **73**: 431-435.
- Hansman, D., y Bullen, M.M. (1967). A resistant pneumococcus. *Lancet* **290**: 264-265.
- Harvey, R.M., Ogunniyi, A.D., Chen, A.Y., y Paton, J.C. (2011). Pneumolysin with low hemolytic activity confers an early growth advantage to *Streptococcus pneumoniae* in the blood. *Infect Immun.* **79**: 4122-4130.
- 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., Coomaraswamy, G., y Morrison, D.A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 11140-11144.

- Hawdon, N.A., Aval, P.S., Barnes, R.J., Gravelle, S.K., Rosengren, J., Khan, S., Ciofu, O., Johansen, H.K., Høiby, N., y Ulanova, M. (2010). Cellular responses of A549 alveolar epithelial cells to serially collected *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients at different stages of pulmonary infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **59**: 207-220.
- Hawlich, H., y Kohl, J. (2006). Complement and Toll-like receptors: key regulators of adaptive immune responses. *Mol Immunol.* **43**: 13-21.
- Heidelberger, M., Goebel, W.F., y Avery, O.T. (1925). The soluble specific substance of pneumococcus: Third Paper. *J Exp Med.* **42**: 727-745.
- Heidelberger, M., y Avery, O.T. (1923). The soluble specific substance of pneumococcus. *J Exp Med.* **38**: 73-79.
- Heidelberger, M., y Avery, O.T. (1924). The Soluble Specific Substance of pneumococcus : Second Paper. *J Exp Med.* **40**: 301-317.
- Henrichsen, J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* **33**: 2759-2762.
- Henriques, B., Kalin, M., Ortqvist, A., Olsson Liljequist, B., Almela, M., Marrie, T.J., Mufson, M.A., Torres, A., Woodhead, M.A., Svenson, S.B., et al. (2000). Molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* causing invasive disease in 5 countries. *J Infect Dis.* **182**: 833-839.
- Henriques-Normark, B., Blomberg, C., Dagerhamn, J., Battig, P., y Normark, S. (2008). The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol.* **6**: 827-837.
- Henriques-Normark, B., y Tuomanen, E.I. (2013). The pneumococcus: epidemiology, *Microbiology.*, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**: a010215.
- Hergott, C.B., Roche, A.M., Naidu, N.A., Mesaros, C., Blair, I.A., y Weiser, J.N. (2015). Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. *J Clin Invest.* **125**: 3878-3890.
- Hermoso, J.A., Lagartera, L., González, A., Stelter, M., García, P., Martínez-Ripoll, M., García, J.L., y Menéndez, M. (2005). Insights into pneumococcal pathogenesis from the crystal structure of the modular teichoic acid phosphorylcholine esterase Pce. *Nat Struct Mol Biol.* **12**: 533-538.
- Hoa, M., Syamal, M., Sachdeva, L., Berk, R., y Cotichia, J. (2009). Demonstration of nasopharyngeal and middle ear mucosal biofilms in an animal model of acute otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* **118**: 292-298.
- Hodge, S., Hodge, G., Scicchitano, R., Reynolds, P.N., y Holmes, M. (2003). Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol.* **81**: 289-296.
- Hogg, J.C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W.M., Buzatu, L., Cherniack, R.M., Rogers, R.M., Sciruba, F.C., Coxson, H.O., et al. (2004). The Nature. of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* **350**: 2645-2653.
- Holmes, A.R., McNab, R., Millsap, K.W., Rohde, M., Hammerschmidt, S., Mawdsley, J.L. y Jenkinson, H.F. (2001) The pavA gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* **41**: 1395-1408.
- Höltje, J.V., y Tomasz, A. (1974). Teichoic acid phosphorylcholine esterase. A novel enzyme activity in pneumococcus. *J Biol Chem.* **249**: 7032-7034.
- Höltje, J.V., y Tomasz, A. (1975). Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmuramyl-L-alanine amidase of pneumococcus. *J Biol Chem.* **250**: 6072-6076.
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Jr., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.J., Fuller, W., et al. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol.* **183**: 5709-5717.
- Hourcade, D.E. (2008). Properdin and complement activation: a fresh perspective. *Curr Drug Targets.* **9**: 158-164.
- Howard, L.V., y Gooder, H. (1974). Specificity of the autolysin of *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. *J Bacteriol.* **117**: 796-804.
- Huang, B., Hubber, A., McDonough, J.A., Roy, C.R., Scidmore, M.A., y Carlyon, J.A. (2010). The *Anaplasma phagocytophilum*-occupied vacuole selectively recruits Rab-GTPases that are predominantly associated with recycling endosomes. *Cell Microbiol.* **12**: 1292-1307.
- Hussain, M., Melegaro, A., Pebody, R.G., George, R., Edmunds, W.J., Talukdar, R., Martín, S.A., Efstratiou, A., y Miller, E. (2005). A longitudinal household study of *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal carriage in a UK setting. *Epidemiol Infect.* **133**: 891-898.
- Hutcherson, J.A., Scott, D.A., y Bagaitkar, J. (2015). Scratching the surface - tobacco-induced bacterial biofilms. *Tob Induc Dis.* **13**: 1.
- 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.
- Iannelli, F., Oggioni, M.R., y Pozzi, G. (2002). Allelic variation in the highly polymorphic locus *pspC* of *Streptococcus pneumoniae*. *Gene.* **284**: 63-71.
- Imai, Y., Kuba, K., Neely, G.G., Yaghubian-Malhami, R., Perkmann, T., van Loo, G., Ermolaeva, M., Veldhuizen, R., Leung, Y.H., Wang, H., et al. (2008). Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell.* **133**: 235-249.
- Iovino, F., Brouwer, M.C., van de Beek, D., Molema, G., y Bijlsma, J.J. (2013). Signalling or binding: the role of the platelet-activating factor receptor in invasive pneumococcal disease. *Cell Microbiol.* **15**: 870-881.

- lovino, F., Molema, G., y Bijlsma, J.J. (2014). *Streptococcus pneumoniae* interacts with plgR expressed by the brain microvascular endothelium but does not co-localize with PAF receptor. *PLoS One*. **9**: e97914.
- Ishii, S., y Shimizu, T. (2000). Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res*. **39**: 41-82.
- Janeway, C.A.J., Travers, P., y Walport, M.J. (2001). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. En The complement system and innate immunity (New York: Garland Science).
- Jarva, H., Janulczyk, R., Hellwage, J., Zipfel, P.F., Bjorck, 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.
- Jauneikaite, E., Tocheva, A.S., Jefferies, J.M., Gladstone, R.A., Faust, S.N., Christodoulides, M., Hibberd, M.L., y Clarke, S.C. (2015). Current methods for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. *J Microbiol Methods*. **113**: 41-49.
- Jedrzejas, M.J. (2001). Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev*. **65**: 187-207.
- Jedrzejas, M.J. (2006). Unveiling molecular mechanisms of pneumococcal surface protein A interactions with antibodies and lactoferrin. *Clin Chim Acta* **367**: 1-10.
- Jefferies, J.M., Johnston, C.H., Kirkham, L.A., Cowan, G.J., Ross, K.S., Smith, A., Clarke, S.C., Brueggemann, A.B., George, R.C., Pichon, B., et al. (2007). Presence of nonhemolytic pneumolysin in serotypes of *Streptococcus pneumoniae* associated with disease outbreaks. *J Infect Dis*. **196**: 936-944.
- Jefferies, J.M., Tocheva, A.S., Rubery, H., Bennett, J., Garland, J., Christodoulides, M., Faust, S.N., Smith, A., Mitchell, T.J., y Clarke, S.C. (2010). Identification of novel pneumolysin alleles from paediatric carriage isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol*. **59**: 808-814.
- Jen, F.E., Warren, M.J., Schulz, B.L., Power, P.M., Swords, W.E., Weiser, J.N., Apicella, M.A., Edwards, J.L., y Jennings, M.P. (2013). Dual pili post-translational modifications synergize to mediate meningococcal adherence to platelet activating factor receptor on human airway cells. *PLoS Pathog*. **9**: e1003377.
- Jensch, I., Gamez, G., Rothe, M., Ebert, S., Fulde, M., Somplatzki, D., Bergmann, S., Petruschka, L., Rohde, M., Nau, R., et al. (2010). PavB is a surface-exposed adhesin of *Streptococcus pneumoniae* contributing to nasopharyngeal colonization and airways infections. *Mol Microbiol*. **77**: 22-43.
- Jeong, J.K., Kwon, O., Lee, Y.M., Oh, D.B., Lee, J.M., Kim, S., Kim, E.H., Le, T.N., Rhee, D.K., y Kang, H.A. (2009). Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* BgaC protein as a novel surface  $\beta$ -galactosidase with specific hydrolysis activity for the Gal $\beta$ 1-3GlcNAc moiety of oligosaccharides. *J Bacteriol*. **191**: 3011-3023.
- 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.
- Jomaa, M., Terry, S., Hale, C., Jones, C., Dougan, G. y Brown, J. (2006) Immunization with the iron uptake ABC transporter proteins PiaA and PiuA prevents respiratory infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* **24**: 5133-5139
- Jomaa, M., Yuste, J., Paton, J.C., Jones, C., Dougan, G. y Brown, J.S. (2005) Antibodies to the iron uptake ABC transporter lipoproteins PiaA and PiuA promote opsonophagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun*. **73**: 6852-6859.
- Joshi, T., Butchar, J.P., y Tridandapani, S. (2006). Fc $\gamma$  receptor signaling in phagocytes. *Int J Hematol*. **84**: 210-216.
- 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.
- Kadioglu, A., Taylor, S., Iannelli, F., Pozzi, G., Mitchell, T.J., y Andrew, P.W. (2002). Upper and lower respiratory tract infection by *Streptococcus pneumoniae* is affected by pneumolysin deficiency and differences in capsule type. *Infect Immun*. **70**: 2886-2890.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., y Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*. **6**: 288-301.
- Kaetzel, C.S. (2005). The polymeric immunoglobulin receptor: bridging innate and adaptive immune responses at mucosal surfaces. *Immunol Rev*. **206**: 83-99.
- Kamerling, J.P. (2000). Pneumococcal polysaccharides: A chemical view. En *Streptococcus pneumoniae Molecular Biology & Mechanisms of Disease* Tomasz, A (ed) Larchmont, NY: Mary Ann Liebert, Inc, pp 81-114.
- Kang, Y.H., Tan, L.A., Carroll, M.V., Gentle, M.E., y Sim, R.B. (2009). Target pattern recognition by complement proteins of the classical and alternative pathways. *Adv Exp Med Biol*. **653**: 117-128.
- Kang, Y.S., Do, Y., Lee, H.K., Park, S.H., Cheong, C., Lynch, R.M., Loeffler, J.M., Steinman, R.M., y Park, C.G. (2006). A dominant complement fixation pathway for pneumococcal polysaccharides initiated by SIGN-R1 interacting with C1q. *Cell*. **125**: 47-58.
- Kharat, A.S., y Tomasz, A. (2006). Drastic reduction in the virulence of *Streptococcus pneumoniae* expressing type 2 capsular polysaccharide but lacking choline residues in the cell wall. *Mol Microbiol*. **60**: 93-107.

- 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.
- Kirkham, L.A., Jefferies, J.M., Kerr, A.R., Jing, Y., Clarke, S.C., Smith, A., y Mitchell, T.J. (2006). Identification of invasive serotype 1 pneumococcal isolates that express nonhemolytic pneumolysin. *J Clin Microbiol.* **44**: 151-159.
- Kirkham, P.A., Spooner, G., Rahman, I., y Rossi, A.G. (2004). Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is compromised by matrix proteins modified by cigarette smoke and lipid peroxidation products. *Biochem Biophys Res Commun.* **318**: 32-37.
- Kislak, J.W., Razavi, L.M., Daly, A.K., y Finland, M. (1965). Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. *Am J Med Sci.* **250**: 261-268.
- Kjaer, T.R., Hansen, A.G., Sorensen, U.B., Holm, A.T., Sorensen, G.L., Jensenius, J.C., y Thiel, S. (2013). M-ficolin binds selectively to the capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* serotypes 19B and 19C and of a *Streptococcus mitis* strain. *Infect Immun.* **81**: 452-459.
- Klein, M., Obermaier, B., Angele, B., Pfister, H.W., Wagner, H., Koedel, U., y Kirschning, C.J. (2008). Innate immunity to pneumococcal infection of the central nervous system depends on toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Infect Dis.* **198**: 1028-1036.
- Knapp, S., Wieland, C.W., van 't Veer, C., Takeuchi, O., Akira, S., Florquin, S., y van der Poll, T. (2004). Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. *J Immunol.* **172**: 3132-3138.
- Ko, K.S., Baek, J.Y., y Song, J.H. (2013). Capsular gene sequences and genotypes of "serotype 6E" *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol.* **51**: 3395-3399.
- Koedel, U., Scheld, W.M., y Pfister, H.W. (2002). Pathogenesis and pathophysiology of pneumococcal meningitis. *Lancet Infect Dis.* **2**: 721-736.
- Koethe, S.M., Nelson, K.E., y Becker, C.G. (1995). Activation of the classical pathway of complement by tobacco glycoprotein (TGP). *J Immunol.* **155**: 826-835.
- Kondos, S.C., Hatfaludi, T., Voskoboinik, I., Trapani, J.A., Law, R.H., 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.
- Koppe, U., Suttorp, N., y Opitz, B. (2012). Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol.* **14**: 460-466.
- Krupar, A., Sorensen, U.B., Matsushita, M., Jensenius, J.C., y Thiel, S. (2005). Effect of capsulation of opportunistic pathogenic bacteria on binding of the pattern recognition molecules mannan-binding lectin, L-ficolin, and H-ficolin. *Infect Immun.* **73**: 1052-1060.
- Kumar, H., Kawai, T., y Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* **30**: 16-34.
- Kumar, S., Ingle, H., Prasad, D.V., y Kumar, H. (2013). Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Crit Rev Microbiol.* **39**: 229-246.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., y Mitchell, R.N. (2007). Obstructive pulmonary disease. *Robbins Basic Pathology* **8 edition**: 486-487.
- Kwak, B.Y., Zhang, Y.M., Yun, M., Heath, R.J., Rock, C.O., Jackowski, S., y Park, H.W. (2002). Structure and mechanism of CTP:phosphocholine cytidyltransferase (LicC) from *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.* **277**: 4343-4350.
- Lagartera, L., González, A., Hermoso, J.A., Saiz, J.L., García, P., García, J.L., y Menéndez, M. (2005). Pneumococcal phosphorylcholine esterase, Pce, contains a metal binuclear center that is essential for substrate binding and catalysis. *Protein Sci.* **14**: 3013-3024.
- Laible, G., Spratt, B.G., y Hakenbeck, R. (1991). Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **5**: 1993-2002.
- Laible, G., y Hakenbeck, R. (1987). Penicillin-binding proteins in  $\beta$ -lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **1**: 355-363.
- Lambris, J.D., Ricklin, D., y Geisbrecht, B.V. (2008). Complement evasion by human pathogens. *Nat Rev Microbiol.* **6**: 132-142.
- Lanie, J.A., Ng, W.L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., Tettelin, H., Glass, J.I., y Winkler, M.E. (2007). Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol.* **189**: 38-51.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* **23**: 2947-2948.
- Laursen, N.S., Magnani, F., Gottfredsen, R.H., Petersen, S.V., y Andersen, G.R. (2012). Structure, function and control of complement C5 and its proteolytic fragments. *Curr Mol Med.* **12**: 1083-1097.
- Law, S.K., y Dodds, A.W. (1997). The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci.* **6**: 263-274.
- 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.
- Letiembre, M., Echchannaoui, H., Bachmann, P., Ferracin, F., Nieto, C., Espinosa, M., y Landmann, R. (2005). Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by granulocytes. *Infect Immun.* **73**: 8397-8401.

- Li, H. (2011). A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics*. **27**: 2987-2993.
- 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, J., Li, J.W., Feng, Z., Wang, J., An, H., Liu, Y., Wang, Y., Wang, K., Zhang, X., Miao, Z., *et al.* (2016). Epigenetic switch driven by DNA inversions dictates phase variation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog*. **12**: e1005762.
- Liñares, J., Pallarés, R., Alonso, T., Pérez, J.L., Ayats, J., Gudiol, F., Viladrich, P.F., y Martín, R. (1992). Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Bellvitge Hospital, Barcelona, Spain (1979–1990). *Clin Infect Dis*. **15**: 99-105.
- Llull, D., López, R., y García, E. (2006). Characteristic sigNature.s of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol*. **44**: 1250-1256.
- Llull, D., Muñoz, R., López, R., and 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.
- Lock, R.A., Zhang, Q.Y., Berry, A.M., y Paton, J.C. (1996). Sequence variation in the *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin gene affecting haemolytic activity and electrophoretic mobility of the toxin. *Microb Pathog*. **21**: 71-83.
- Lofdahl, M.J., Roos-Engstrand, E., Pourazar, J., Bucht, A., Dahlen, B., Elmberger, G., Blomberg, A., y Skold, C.M. (2008). Increased intraepithelial T-cells in stable COPD. *Respir Med*. **102**: 1812-1818.
- López, A. (2012). Estudio de la variabilidad genética, factores de virulencia y mecanismos de invasión del epitelio respiratorio humano durante la infección por *Haemophilus influenzae* no tipable. (Universidad de las Islas Baleares, España).
- López, R. (2006). Pneumococcus: the sugar-coated bacteria. *Int Microbiol*. **9**: 179-190.
- Lopez, R., García, E., García, P., Ronda, C., y Tomasz, A. (1982). Choline-containing bacteriophage receptors in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol*. **151**: 1581-1590.
- 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.
- Low, D.E. (2005). Fluoroquinolone-resistant pneumococci: maybe resistance isn't futile? *Clin Infect Dis*. **40**: 236-238.
- Lund, E., y Henrichsen, J. (1978). Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev*. **12**: 241-262.
- Macintyre, S.S., Schultz, D., y Kushner, I. (1982). Biosynthesis of C-reactive protein. *Ann N Y Acad Sci* **389**: 76-87.
- Mackenzie, G.A., Leach, A.J., Carapetis, J.R., Fisher, J., y Morris, P.S. (2010). Epidemiology of nasopharyngeal carriage of respiratory bacterial pathogens in children and adults: cross-sectional surveys in a population with high rates of pneumococcal disease. *BMC Infect Dis*. **10**: 304.
- MacNee, W. (2005). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**: 258-266; discussion 290-251.
- Maestro, B., y Sanz, J.M. (2016). Choline binding proteins from *Streptococcus pneumoniae*: a dual role as enzybiotics and targets for the design of new antimicrobials. *Antibiotics (Basel)* **5**: 21.
- Mahler, D.A., Wire, P., Horstman, D., Chang, C.N., Yates, J., Fischer, T., y Shah, T. (2002). Effectiveness of fluticasone propionate and salmeterol combination delivered via the Diskus device in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. **166**: 1084-1091.
- Majcherzyk, P.A., Langen, H., Heumann, D., Fountoulakis, M., Glauser, M.P., y Moreillon, P. (1999). Digestion of *Streptococcus pneumoniae* cell walls with its major peptidoglycan hydrolase releases branched stem peptides carrying proinflammatory activity. *J Biol Chem*. **274**: 12537-12543.
- Makou, E., Herbert, A.P., y Barlow, P.N. (2013). Functional anatomy of complement factor H. *Biochemistry*. **52**: 3949-3962.
- Malley, R., Henneke, P., Morse, S.C., Cieslewicz, M.J., Lipsitch, M., Thompson, C.M., Kurt-Jones, E., Paton, J.C., Wessels, M.R., y Golenbock, D.T. (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. **100**: 1966-1971.
- 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.
- Marimón, J.M., Monasterio, A., Ercibengoa, M., Pascual, J., Prieto, I., Simon, L., y Pérez-Trallero, E. (2010). Antibody microarray typing, a novel technique for *Streptococcus pneumoniae* serotyping. *J Microbiol Methods*. **80**: 274-280.
- 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.
- Marriott, H.M., Mitchell, T.J., y Dockrell, D.H. (2008). Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr Mol Med*. **8**: 497-509.
- Marriott, H.M., y Dockrell, D.H. (2007). The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res*. **33**: 493-505.

- Martí-Lliteras, P., Regueiro, V., Morey, P., Hood, D.W., Saus, C., Sauleda, J., Agusti, A.G., Bengoechea, J.A., y Garmendia, J. (2009). Nontypeable *Haemophilus influenzae* clearance by alveolar macrophages is impaired by exposure to cigarette smoke. *Infect Immun.* **77**: 4232-4242.
- Martín, M., Turco, J.H., Zegans, M.E., Facklam, R.R., Sodha, S., Elliott, J.A., Pryor, J.H., Beall, B., Erdman, D.D., Baumgartner, Y.Y., *et al.* (2003). An outbreak of conjunctivitis due to atypical *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med.* **348**: 1112-1121.
- Martínez, 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.
- Martner, A., Dahlgren, C., Paton, J.C., y Wold, A.E. (2008). Pneumolysin released during *Streptococcus pneumoniae* autolysis is a potent activator of intracellular oxygen radical production in neutrophils. *Infect Immun.* **76**: 4079-4087.
- Martner, A., Skovbjerg, S., Paton, J.C., y Wold, A.E. (2009). *Streptococcus pneumoniae* autolysis prevents phagocytosis and production of phagocyte-activating cytokines. *Infect Immun.* **77**: 3826-3837.
- McCarty, M., and 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.
- McCool, T.L., y Weiser, J.N. (2004). Limited role of antibody in clearance of *Streptococcus pneumoniae* in a murine model of colonization. *Infect Immun.* **72**: 5807-5813.
- McCullers, J.A. (2006). Insights into the interaction between influenza virus and pneumococcus. *Clin Microbiol Rev.* **19**: 571-582.
- McCullers, J.A., y Rehg, J.E. (2002). Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor. *J Infect Dis.* **186**: 341-350.
- McCullers, J.A., y Tuomanen, E.I. (2001). Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci.* **6**: D877-889.
- McEver, R.P., y Cummings, R.D. (1997). Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest.* **100**: 485-491.
- McGee, L., McDougal, L., Zhou, J., Spratt, B.G., Tenover, F.C., George, R., Hakenbeck, R., Hryniewicz, W., Lefevre, J.C., Tomasz, A., *et al.* (2001). Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol.* **39**: 2565-2571.
- Medicus, R.G., Gotze, O., y Muller-Eberhard, H.J. (1976). Alternative pathway of complement: recruitment of precursor properdin by the labile C3/C5 convertase and the potentiation of the pathway. *J Exp Med.* **144**: 1076-1093.
- Medzhitov, R., y Janeway, C., Jr. (2000). Innate immunity. *N Engl J Med.* **343**: 338-344.
- Medzhitov, R., y Janeway, C.A., Jr. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science.* **296**: 298-300.
- Metcalfe, H.J., Lea, S., Hughes, D., Khalaf, R., Abbott-Banner, K., y Singh, D. (2014). Effects of cigarette smoke on Toll-like receptor (TLR) activation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) macrophages. *Clin Exp Immunol.* **176**: 461-472.
- Mitchell, T.J., Mendez, F., Paton, J.C., Andrew, P.W., y Boulnois, G.J. (1990). Comparison of pneumolysin genes and proteins from *Streptococcus pneumoniae* types 1 and 2. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4010.
- 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., Gresham, H.D., y Du Clos, T.W. (2001). Serum amyloid P component and C-reactive protein mediate phagocytosis through murine FcγRs. *J Immunol.* **166**: 1200-1205.
- Mold, C., Nakayama, S., Holzer, T.J., Gewurz, H., y Du Clos, T.W. (1981). C-reactive protein is protective against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J Exp Med.* **154**: 1703-1708.
- Mold, C., Rodic-Polic, B., y Du Clos, T.W. (2002). Protection from *Streptococcus pneumoniae* infection by C-reactive protein and natural antibody requires complement but not Fc gamma receptors. *J Immunol.* **168**: 6375-6381.
- 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.
- Molina, R., González, A., Stelter, M., Pérez-Dorado, I., Kahn, R., Morales, M., Moscoso, M., Campuzano, S., Campillo, N.E., Mobashery, S., *et al.* (2009). Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO Rep.* **10**: 246-251.
- 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.
- Morales, M., Martín-Galiano, A.J., Domenech, M., y García, E. (2015). Insights into the evolutionary relationships of *LytA* autolysin and Ply pneumolysin-like genes in *Streptococcus pneumoniae* and related streptococci. *Genome Biol. Evol.* **7**: 2747-2761.

- Moreillon, P., y Majcherczyk, P.A. (2003). Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria. *Scand J Infect Dis.* **35**: 632-641.
- Moreillon, P., y Tomasz, A. (1988). Penicillin resistance and defective lysis in clinical isolates of pneumococci: evidence for two kinds of antibiotic pressure operating in the clinical environment. *J Infect Dis.* **157**: 1150-1157.
- Morens, D.M., Folkers, G.K., y Fauci, A.S. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature.* **430**: 242-249.
- Morgan, B.P., y Gasque, P. (1997). Extrahepatic complement biosynthesis: where, when and why? *Clin Exp Immunol.* **107**: 1-7.
- Morrison, D.A. (1978). Transformation in pneumococcus: protein content of eclipse complex. *J Bacteriol.* **136**: 548-557.
- Mortensen, R.F., y Duszkiwicz, J.A. (1977). Mediation of CRP-dependent phagocytosis through mouse macrophage Fc-receptors. *J Immunol.* **119**: 1611-1616.
- Mortier-Barriere, I., de Saizieu, A., Claverys, J.P., y Martín, B. (1998). Competence-specific induction of *recA* is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **27**: 159-170.
- 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.
- 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., 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 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.
- Moskovich, O., y Fishelson, Z. (2007). Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex. *J Biol Chem.* **282**: 29977-29986.
- 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.
- Muller-Eberhard, H.J., Polley, M.J., y Calcott, M.A. (1967). Formation and functional significance of a molecular complex derived from the second and the fourth component of human complement. *J Exp Med.* **125**: 359-380.
- Muñoz, F.M., Hawkins, E.P., Bullard, D.C., Beaudet, A.L., y Kaplan, S.L. (1997). Host defense against systemic infection with *Streptococcus pneumoniae* is impaired in E-, P-, and E-/P-selectin-deficient mice. *J Clin Invest.* **100**: 2099-2106.
- Murphy, T.F., Brauer, A.L., Eschberger, K., Lobbins, P., Grove, L., Cai, X., y Sethi, S. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* **177**: 853-860.
- Murphy, T.F., Brauer, A.L., Grant, B.J., y Sethi, S. (2005). *Moraxella catarrhalis* in chronic obstructive pulmonary disease: burden of disease and immune response. *Am J Respir Crit Care Med.* **172**: 195-199.
- Murphy, T.F., Brauer, A.L., Schiffmacher, A.T., y Sethi, S. (2004). Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* **170**: 266-272.
- Murray, R.L., Britton, J., y Leonardi-Bee, J. (2012). Second hand smoke exposure and the risk of invasive meningococcal disease in children: systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* **12**: 1062.
- Mutepe, N.D., Cockeran, R., Steel, H.C., Theron, A.J., Mitchell, T.J., Feldman, C., y Anderson, R. (2013). Effects of cigarette smoke condensate on pneumococcal biofilm formation and pneumolysin. *Eur Resp J.* **41**: 392-395.
- Nadigel, J., Prefontaine, D., Baglolle, C.J., Maltais, F., Bourbeau, J., Eidelman, D.H., y Hamid, Q. (2011). Cigarette smoke increases TLR4 and TLR9 expression and induces cytokine production from CD8<sup>+</sup> T cells in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* **12**: 149.
- Nauseef, W.M. (2007). How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev.* **219**: 88-102.
- Neufeld, F. (1902). Ueber die agglutination der pneumokokken und über die theorien der agglutination. *Z Hyg Infektinskr* **40**: 54-72.
- Nishimura, D., Sakai, H., Sato, T., Sato, F., Nishimura, S., Toyama-Sorimachi, N., Bartsch, J.W., y Sehara-Fujisawa, A. (2015). Roles of ADAM8 in elimination of injured muscle fibers prior to skeletal muscle regeneration. *Mech Dev.* **135**: 58-67.
- Nishimura, Y., Shimojima, M., Tano, Y., Miyamura, T., Wakita, T., y Shimizu, H. (2009). Human P-selectin glycoprotein ligand-1 is a functional receptor for enterovirus 71. *Nat Med.* **15**: 794-797.
- Nuorti, J.P., Butler, J.C., Farley, M.M., Harrison, L.H., McGeer, A., Kolczak, M.S., y Breiman, R.F. (2000). Cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med.* **342**: 681-689.
- O'Neill, L.A., Golenbock, D., Bowie, A.G. (2013). The history of Toll-like receptors-redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* **6**: 453-60.
- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T., et al. (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet.* **374**: 893-902.

- O'Brien, K.L., y Levine, O.S. (2006). Effectiveness of pneumococcal conjugate *Vaccine*. *Lancet*. **368**: 1469-1470.
- Ochs, M.M., Bartlett, W., Briles, D.E., Hicks, B., Jurkuvenas, A., Lau, P., Ren, B., y Millar, A. (2008). *Vaccine*-induced human antibodies to PspA augment complement C3 deposition on *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog*. **44**: 204-214.
- OECD (2012). Asthma and COPD prevalence. In Health at a Glance: Europe 2012 (Paris: OECD). <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/8112121e.pdf?expires=1490291101&id=id&accname=guest&checksum=504F89F6E926E3F7AF2C43C1D3EB99B3>
- Oliver, M.B., van der Linden, M.P., Kuntzel, S.A., Saad, J.S., y Nahm, M.H. (2013). Discovery of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6 variants with glycosyltransferases synthesizing two differing repeating units. *J Biol Chem*. **288**: 25976-25985.
- OMS (2016). Neumonía. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/>.
- Orihuela, C.J., Gao, G., Francis, K.P., Yu, J., y Tuomanen, E.I. (2004). Tissue-specific contributions of pneumococcal virulence factors to pathogenesis. *J Infect Dis*. **190**: 1661-1669.
- Ortega, E., Barriga, C., y Rodríguez, A.B. (1994). Decline in the phagocytic function of alveolar macrophages from mice exposed to cigarette smoke. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. **17**: 77-84.
- Ortega, E., Hueso, F., Collazos, M.E., Pedrera, M.I., Barriga, C., y Rodríguez, A.B. (1992). Phagocytosis of latex beads by alveolar macrophages from mice exposed to cigarette smoke. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. **15**: 137-142.
- O'Shaughnessy, T.C., Ansari, T.W., Barnes, N.C., y Jeffery, P.K. (1997). Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes with FEV1. *Am J Respir Crit Care Med*. **155**: 852-857.
- O'Toole, G.A., y Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. **28**: 449-461.
- Page, A.J., Cummins, C.A., Hunt, M., Wong, V.K., Reuter, S., Holden, M.T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J.A., y Parkhill, J. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. **31**: 3691-3693.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., y Muller-Eberhard, H.J. (1981). Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med*. **154**: 856-867.
- Paradiso, P.R. (2011). Advances in pneumococcal disease prevention: 13-valent pneumococcal conjugate *Vaccine*. for infants and children. *Clin Infect Dis*. **52**: 1241-1247.
- Paradiso, P.R. (2012). Pneumococcal conjugate *Vaccine*. for adults: a new paradigm. *Clin Infect Dis*. **55**: 259-264.
- Park, I.H., Park, S., Hollingshead, S.K., y Nahm, M.H. (2007a). Genetic basis for the new pneumococcal serotype, 6C. *Infect Immun*. **75**: 4482-4489.
- Park, I.H., Pritchard, D.G., Cartee, R., Brandao, A., Brandileone, M.C., y Nahm, M.H. (2007b). Discovery of a new capsular serotype (6C) within serogroup 6 of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. **45**: 1225-1233.
- Park, J., Choi, K.S., y Dumler, J.S. (2003). Major surface protein 2 of *Anaplasma phagocytophilum* facilitates adherence to granulocytes. *Infect Immun*. **71**: 4018-4025.
- Pasteur (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquée par la salive d'un enfant mort de la rage. *Bull Acad Med (Paris)* **10**: 94-103.
- Patel, P.B., Díaz, M.C., Bennett, J.E., y Attia, M.W. (2007). Clinical features of bacterial conjunctivitis in children. *Acad Emerg Med*. **14**: 1-5.
- Patterson, C.M., Morrison, R.L., D'Souza, A., Teng, X.S., y Happel, K.I. (2012). Inhaled fluticasone propionate impairs pulmonary clearance of *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Respir Res*. **13**: 40.
- Pérez-Dorado, I., Galán-Bartual, S., y Hermoso, J.A. (2012). Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol Oral Microbiol* **27**: 221-245.
- Pérez-Dorado, I., González, A., Morales, M., Sanles, R., Striker, W., Vollmer, W., Mobashery, S., García, J.L., Martínez-Ripoll, M., García, P., *et al.* (2010). Insights into pneumococcal fratricide from the crystal structures of the modular killing factor LytC. *Nat Struct Mol Biol*. **17**: 576-581.
- 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.
- Phipps, J.C., Aronoff, D.M., Curtis, J.L., Goel, D., O'Brien, E., y Mancuso, P. (2010). Cigarette smoke exposure impairs pulmonary bacterial clearance and alveolar macrophage complement-mediated phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun*. **78**: 1214-1220.
- Podack, E.R., Kolb, W.P., y Muller-Eberhard, H.J. (1978). The C5b-6 complex: formation, isolation, and inhibition of its activity by lipoprotein and the S-protein of human serum. *J Immunol*. **120**: 1841-1848.
- Porat, N., Arguedas, A., Spratt, B.G., Trefler, R., Brilla, E., Loaiza, C., Godoy, D., Bilek, N., y Dagan, R. (2004). Emergence of penicillin-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* clones expressing serotypes not present in the antipneumococcal conjugate *Vaccine*. *J Infect Dis*. **190**: 2154-2161.
- Porat, N., Greenberg, D., Givon-Lavi, N., Shuval, D.S., Trefler, R., Segev, O., Hanage, W.P., y Dagan, R. (2006). The important role of nontypable *Streptococcus pneumoniae* international clones in acute conjunctivitis. *J Infect Dis*. **194**: 689-696.

- Pracht, D., Elm, C., Gerber, J., Bergmann, S., Rohde, M., Seiler, M., Kim, K.S., Jenkinson, H.F., Nau, R., y Hammerschmidt, S. (2005). PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. *Infect Immun.* **73**: 2680-2689.
- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., y McIntyre, T.M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.* **69**: 419-445.
- Qiu, F., Liang, C.L., Liu, H., Zeng, Y.Q., Hou, S., Huang, S., Lai, X., y Dai, Z. (2017). Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget.* **8**: 268-284.
- 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., 3rd, Thornton, J.A., y McDaniel, L.S. (2008). Peritoneal challenge modulates expression of pneumococcal surface protein C during bacteremia in mice. *Infect Immun.* **76**: 1122-1127.
- Quin, L.R., Onwubiko, C., Moore, Q.C., Mills, M.F., McDaniel, L.S., y Carmicle, S. (2007). Factor H binding to PspC of *Streptococcus pneumoniae* increases adherence to human cell lines in vitro and enhances invasion of mouse lungs in vivo. *Infect Immun.* **75**: 4082-4087.
- Rabe, K.F., Hurd, S., Anzueto, A., Barnes, P.J., Buist, S.A., Calverley, P., Fukuchi, Y., Jenkins, C., Rodríguez-Roisin, R., van Weel, C., et al. (2007). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med.* **176**: 532-555.
- Radin, J.N., Orihuela, C.J., Murti, G., Guglielmo, C., Murray, P.J., y Tuomanen, E.I. (2005).  $\beta$ -Arrestin 1 participates in platelet-activating factor receptor-mediated endocytosis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **73**: 7827-7835.
- Raman, A.S., Swinburne, A.J., y Fedullo, A.J. (1983). Pneumococcal adherence to the buccal epithelial cells of cigarette smokers. *Chest.* **83**: 23-27.
- Ramos-Sevillano, E., Moscoso, M., García, P., García, E., y Yuste, J. (2011). Nasopharyngeal colonization and invasive disease are enhanced by the cell wall hydrolases LytB and LytC of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* **6**: e23626.
- Ramos-Sevillano, E., Rodríguez-Sosa, C., Díez-Martínez, R., Giménez, M.J., Olmedillas, E., García, P., García, E., Aguilar, L., y Yuste, J. (2012). Macrolides and  $\beta$ -lactam antibiotics enhance C3b deposition on the surface of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains by a LytA autolysin-dependent mechanism. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**: 5534-5540.
- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., Campuzano, S., Moscoso, M., González-Camacho, F., Domenech, M., Rodríguez de Córdoba, S., Sánchez-Madrid, F., Brown, J.S., García, E., et al. (2015). Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on *Streptococcus pneumoniae* sensitivity to the host immune response. *Infect Immun.* **83**: 591-603.
- Ramos-Sevillano, E., Urzainqui, A., de Andrés, B., Gonzalez-Tajuelo, R., Domenech, M., González-Camacho, F., Sánchez-Madrid, F., Brown, J.S., García, E., y Yuste, J. (2016). PSGL-1 on leukocytes is a critical component of the host immune response against invasive pneumococcal disease. *PLoS Pathog.* **12**: e1005500.
- Rane, L., y Subbarow, Y. (1940a). Choline, pantothenic acid, and nicotinic acid as essential growth factors for pneumococcus. *J Biol Chem.* **134**: 455-456.
- Rane, L., y Subbarow, Y. (1940b). Nutritional requirements of the pneumococcus: I. Growth factors for types I, II, V, VII, VIII. *J Bacteriol.* **40**: 695-704.
- Ren, B., McCrory, M.A., Pass, C., Bullard, D.C., Ballantyne, C.M., Xu, Y., Briles, D.E., y Szalai, A.J. (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.
- 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.
- Rom, O., Avezov, K., Aizenbud, D., y Reznick, A.Z. (2013). Cigarette smoking and inflammation revisited. *Respir Physiol Neurobiol.* **187**: 5-10.
- Romero-Steiner, S., Libutti, D., Pais, L.B., Dykes, J., Anderson, P., Whitin, J.C., Keyserling, H.L., y Carlone, G.M. (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.
- Rosell, A., Monso, E., Soler, N., Torres, F., Angrill, J., Riise, G., Zalacain, R., Morera, J., y Torres, A. (2005). Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Arch Intern Med.* **165**: 891-897.
- Rosenberger, C.M., y Finlay, B.B. (2003). Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nature. Rev Mol Cell Biol* **4**: 385-396.
- Rosenow, C., Ryan, P., Weiser, J.N., Johnson, S., Fontan, P., Ortvist, A., y Masure, H.R. (1997). Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **25**: 819-829.
- Sadowy, E., Kuch, A., Gniadkowski, M., y Hryniewicz, W. (2010). Expansion and evolution of the *Streptococcus pneumoniae* Spain<sup>9V</sup>-ST156 clonal complex in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 1720-1727.

- Saetta, M., Di Stefano, A., Turato, G., Facchini, F.M., Corbino, L., Mapp, C.E., Maestrelli, P., Ciaccia, A., y Fabbri, L.M. (1998). CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* **157**: 822-826.
- 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.
- Sako, D., Chang, X.J., Barone, K.M., Vachino, G., White, H.M., Shaw, G., Veldman, G.M., Bean, K.M., Ahern, T.J., Furie, B., *et al.* (1993). Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* **75**: 1179-1186.
- Sánchez-Beato, A.R., López, R., y García, J.L. (1998). Molecular characterization of PcpA: a novel choline-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett.* **164**: 207-214.
- Sánchez-Puelles, J.M., Ronda, C., García, J.L., García, P., López, R., y García, E. (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lytA* gene. *Eur J Biochem.* **158**: 289-293.
- Sato, K., Quartey, M.K., Liebler, C.L., Le, C.T., y Giebink, G.S. (1996). Roles of autolysin and pneumolysin in middle ear inflammation caused by a type 3 *Streptococcus pneumoniae* strain in the chinchilla otitis media model. *Infect Immun.* **64**: 1140-1145.
- Schmeck, B., Huber, S., Moog, K., Zahlten, J., Hocke, A.C., Opitz, B., Hammerschmidt, S., Mitchell, T.J., Kracht, M., Rosseau, S., *et al.* (2006). Pneumococci induced TLR- and Rac1-dependent NF- $\kappa$ B-recruitment to the IL-8 promoter in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **290**: L730-L737.
- Schroder, N.W., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zahringer, U., Gobel, U.B., Weber, J.R., y Schumann, R.R. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem.* **278**: 15587-15594.
- Schulz zur Wiesch, P., Engelstadter, J., y Bonhoeffer, S. (2010). Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* **54**: 2085-2095.
- Scott, J.R., Hanage, W.P., Lipsitch, M., Millar, E.V., Moulton, L.H., Hinds, J., Reid, R., Santosham, M., y O'Brien, K.L. (2012). Pneumococcal sequence type replacement among American Indian children: a comparison of pre- and routine-PCV7 eras. *Vaccine.* **30**: 2376-2381.
- 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.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics.* **30**: 2068-2069.
- 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.
- 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.
- Serino, L., y Virji, M. (2000). Phosphorylcholine decoration of lipopolysaccharide differentiates commensal *Neisseriae* from pathogenic strains: identification of *licA*-type genes in commensal *Neisseriae*. *Mol Microbiol.* **35**: 1550-1559.
- Sethi, S., Evans, N., Grant, B.J., y Murphy, T.F. (2002). New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* **347**: 465-471.
- Sethi, S., Maloney, J., Grove, L., Wrona, C., y Berenson, C.S. (2006). Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* **173**: 991-998.
- Sethi, S., Wrona, C., Eschberger, K., Lobbins, P., Cai, X., y Murphy, T.F. (2008). Inflammatory profile of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* **177**: 491-497.
- Sethi, S., y Murphy, T.F. (2008). Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* **359**: 2355-2365.
- Shak, J.R., Ludewick, H.P., Howery, K.E., Sakai, F., Yi, H., Harvey, R.M., Paton, J.C., Klugman, K.P., y Vidal, J.E. (2013). Novel role for the *Streptococcus pneumoniae* toxin pneumolysin in the assembly of biofilms. *mBio.* **4**: e00655-00613.
- Shak, J.R., Vidal, J.E., y Klugman, K.P. (2013). Influence of bacterial interactions on pneumococcal colonization of the nasopharynx. *Trends Microbiol.* **21**: 129-135.
- Shen, P., Morissette, M.C., Vanderstocken, G., Gao, Y., Hassan, M., Roos, A., Thayaparan, D., Merlano, M., Dorrington, M.G., Nikota, J.K., *et al.* (2016). Cigarette smoke attenuates the nasal host response to *Streptococcus pneumoniae* and predisposes to invasive pneumococcal disease in mice. *Infect Immun.* **84**: 1536-1547.
- Shukla, S.D., Fairbairn, R.L., Gell, D.A., Latham, R.D., Sohail, S.S., Walters, E.H., y O'Toole, R.F. (2016). An antagonist of the platelet-activating factor receptor inhibits adherence of both nontypeable *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* to cultured human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* **11**: 1647-1655.
- Shukla, S.D., Muller, H.K., Latham, R., Sohail, S.S., y Walters, E.H. (2016). Platelet-activating factor receptor (PAFr) is upregulated in small airways and alveoli of smokers and COPD patients. *Respirology.* **21**: 504-510.
- Shukla, S.D., Sohail, S.S., Mahmood, M.Q., Reid, D., Muller, H.K., y Walters, E.H. (2014). Airway epithelial platelet-activating factor receptor expression is markedly upregulated in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* **9**: 853-861.

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., *et al.* (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* **7**: 539.
- 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.
- Sjostrom, K., Blomberg, C., Fernebro, J., Dagerhamn, J., Morfeldt, E., Barocchi, M.A., Browall, S., Moschioni, M., Andersson, M., Henriques, F., *et al.* (2007). Clonal success of piliated penicillin nonsusceptible pneumococci. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**: 12907-12912.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V., y Sneath, P.H.A. (1980). Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol.* **30**: 225-420.
- Skold, C.M., Lundahl, J., Hallden, G., Hallgren, M., y Eklund, A. (1996). Chronic smoke exposure alters the phenotype pattern and the metabolic response in human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol.* **106**: 108-113.
- Sleeman, K.L., Griffiths, D., Shackley, F., Diggle, L., Gupta, S., Maiden, M.C., Moxon, E.R., Crook, D.W., y Peto, T.E. (2006). Capsular serotype-specific attack rates and duration of carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a population of children. *J Infect Dis.* **194**: 682-688.
- Song, J.Y., Nahm, M.H., y Moseley, M.A. (2013). Clinical implications of pneumococcal serotypes: invasive disease potential, clinical presentations, and antibiotic resistance. *J Korean Med Sci.* **28**: 4-15.
- Sorensen, I.J., Nielsen, E.H., Andersen, O., Danielsen, B., y Svehag, S.E. (1996). Binding of complement proteins C1q and C4bp to serum amyloid P component (SAP) in solid contra liquid phase. *Scand J Immunol.* **44**: 401-407.
- Sørensen, U.B.S., Blom, J., Birch-Andersen, A., y Henrichsen, J. (1988). Ultrastructural localization of capsules, cell wall polysaccharide, cell wall proteins, and F antigen in pneumococci. *Infect Immun.* **56**: 1890-1896.
- Stamatakis, A. (2015). Using RAxML to infer phylogenies. *Curr Protoc Bioinformatics.* **51**: 6 14 11-14.
- Stanhope, M.J., Lefebvre, T., Walsh, S.L., Becker, J.A., Lang, P., Pavinski Bitar, P.D., Miller, L.A., Italia, M.J., y Amrine-Madsen, H. (2008). Positive selection in penicillin-binding proteins 1a, 2b, and 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its correlation with amoxicillin resistance development. *Infect Genet Evol.* **8**: 331-339.
- 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* **37**: 781-783.
- Stolberg, V.R., McCubbrey, A.L., Freeman, C.M., Brown, J.P., Crudgington, S.W., Taitano, S.H., Saxton, B.L., Mancuso, P., y Curtis, J.L. (2015). Glucocorticoid-augmented efferocytosis inhibits pulmonary pneumococcal clearance in mice by reducing alveolar macrophage bactericidal function. *J Immunol.* **195**: 174-184.
- Stuart, L.M., y Ezekowitz, R.A. (2005). Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* **22**: 539-550.
- Sulikowska, A., Grzesiowski, P., Sadowy, E., Fiett, J., y Hryniewicz, W. (2004). Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from the nasopharynges of asymptomatic children and molecular analysis of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* strain replacement in the nasopharynx. *J Clin Microbiol.* **42**: 3942-3949.
- Suresh, M.V., Singh, S.K., Ferguson, D.A., Jr., 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.
- Suri, R., Mallia, P., Martín, J.E., Footitt, J., Zhu, J., Trujillo-Torralbo, M.B., Johnston, S.L., y Grigg, J. (2014). Bronchial platelet-activating factor receptor in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* **108**: 898-904.
- Szalai, A.J., Agrawal, A., Greenhough, T.J., y Volanakis, J.E. (1999). C-reactive protein: structural biology and host defense function. *Clin Chem Lab Med.* **37**: 265-270.
- Szalai, A.J., Briles, D.E., y Volanakis, J.E. (1995). Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice. *J Immunol.* **155**: 2557-2563.
- Szalai, A.J., Briles, D.E., y Volanakis, J.E. (1996). Role of complement in C-reactive-protein-mediated protection of mice from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* **64**: 4850-4853.
- Takata, Y., Kinoshita, T., Kozono, H., Takeda, J., Tanaka, E., Hong, K., y Inoue, K. (1987). Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical complement pathway. *J Exp Med.* **165**: 1494-1507.
- Tarragó, D., Aguilar, L., García, R., Gimenez, M.J., Granizo, J.J., y Fenoll, A. (2011). Evolution of clonal and susceptibility profiles of serotype 19A *Streptococcus pneumoniae* among invasive isolates from children in Spain, 1990 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**: 2297-2302.
- Tarragó, D., Fenoll, A., Sánchez-Tatay, D., Arroyo, L.A., Muñoz-Almagro, C., Esteva, C., Hausdorff, W.P., Casal, J., y Obando, I. (2008). Identification of pneumococcal serotypes from culture-negative clinical specimens by novel real-time PCR. *Clin Microbiol Infect.* **14**: 828-834.
- Taylor, J.D. (2010). COPD and the response of the lung to tobacco smoke exposure. *Pulm Pharmacol Ther* **23**: 376-383.
- Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., y Engel, P. (1995). The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J.* **9**: 866-873.
- Terrasse, R., Tachet-Delorme, P., Moriscot, C., Perard, J., Schoehn, G., Vernet, T., Thielens, N.M., Di Guilmi, A.M., y Frachet, P. (2012). Human and pneumococcal cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) proteins are both ligands of human C1q protein. *J Biol Chem.* **287**: 42620-42633.
- Thomas, J.C., Figueira, M., Fennie, K.P., Laufer, A.S., Kong, Y., Pichichero, M.E., Pelton, S.I., y Pettigrew, M.M. (2011). *Streptococcus pneumoniae* clonal complex 199: genetic diversity and tissue-specific virulence. *PLoS One.* **6**: e18649.

- 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 $\gamma$ R on dendritic cells. *J Immunol.* **178**: 7283-7291.
- Thornton, J.A., Durick-Eder, K., y Tuomanen, E.I. (2010). Pneumococcal pathogenesis: "innate invasion" yet organ-specific damage. *J Mol Med. (Berl)* **88**: 103-107.
- Tillett, W.S., Goebel, W.F., y Avery, O.T. (1930). Chemical and immunological properties of a species-specific carbohydrate of pneumococci. *J Exp Med.* **52**: 895-900.
- 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. (1968). Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **59**: 86-93.
- Tomasz, A., Albino, A., y Zanati, E. (1970). Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature.* **227**: 138-140.
- Tomasz, A., y Waks, S. (1975). Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **72**: 4162-4166.
- 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.
- Torres, A., Blasi, F., Dartois, N., y Akova, M. (2015). Which individuals are at increased risk of pneumococcal disease and why? Impact of COPD, asthma, smoking, diabetes, and/or chronic heart disease on community-acquired pneumonia and invasive pneumococcal disease. *Thorax.* **70**: 984-989.
- Troese, M.J., y Carlyon, J.A. (2009). *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infect Immun.* **77**: 4018-4027.
- Tuomanen, E.I. (2000). Pathogenesis of pneumococcal inflammation: otitis media. *Vaccine.* **19 Suppl 1**: S38-S40.
- Uchiyama, S., Carlin, A.F., Khosravi, A., Weiman, S., Banerjee, A., Quach, D., et al. (2009) The surface anchored NanaA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J. Exp. Med.* **206**: 1845-1852.
- Underhill, D.M., y Goodridge, H.S. (2012). Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol.* **12**: 492-502.
- UNICEF (2015). UNICEF global databases 2015. <https://data.unicef.org/>.
- UNICEF, y WHO (2006). Pneumonia: the forgotten killer of children. [http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia\\_The\\_Forgotten\\_Killer\\_of\\_Children.pdf](http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf).
- Uricaru, R., Rizk, G., Lacroix, V., Quillery, E., Plantard, O., Chikhi, R., Lemaitre, C., y Peterlongo, P. (2015). Reference-free detection of isolated SNPs. *Nucleic Acids Res.* **43**: e11.
- van der Poll, T., y Opal, S.M. (2009). Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet.* **374**: 1543-1556.
- Vassal-Stermann, E., Lacroix, M., Gout, E., Laffly, E., Pedersen, C.M., Martín, L., Amoroso, A., Schmidt, R.R., Zahringer, U., Gaboriaud, C., et al. (2014). Human L-ficolin recognizes phosphocholine moieties of pneumococcal teichoic acid. *J Immunol.* **193**: 5699-5708.
- Vicente-Manzanares, M., y Sánchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol.* **4**: 110-122.
- 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 phosphorylcholine esterase in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **39**: 1610-1622.
- von Scheele, I., Larsson, K., Dahlen, B., Billing, B., Skedinger, M., Lantz, A.S., y Palmberg, L. (2011). Toll-like receptor expression in smokers with and without COPD. *Respir Med.* **105**: 1222-1230.
- Voss, M., Wonnenberg, B., Honecker, A., Kamyschnikow, A., Herr, C., Bischoff, M., Tschernig, T., Bals, R., y Beisswenger, C. (2015). Cigarette smoke-promoted acquisition of bacterial pathogens in the upper respiratory tract leads to enhanced inflammation in mice. *Respir Res.* **16**: 41.
- 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. (2001a). Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* **344**: 1058-1066.
- Walport, M.J. (2001b). Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* **344**: 1140-1144.
- Wang, L., Jiang, Y.L., Zhang, J.R., Zhou, C.Z., y Chen, Y. (2015). Structural and enzymatic characterization of the choline kinase LicA from *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One.* **10**: e0120467.
- Wang, X.Y., Kilgore, P.E., Lim, K.A., Wang, S.M., Lee, J., Deng, W., Mo, M.Q., Nyambat, B., Ma, J.C., Favorov, M.O., 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.
- Wedzicha, J.A., Calverley, P.M., Seemungal, T.A., Hagan, G., Ansari, Z., Stockley, R.A., y Investigators, I. (2008). The prevention of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations by salmeterol/fluticasone propionate or tiotropium bromide. *Am J Respir Crit Care Med*. **177**: 19-26.
- Weidel, W., y Pelzer, H. (1964). Bagshaped macromolecules—a new outlook on bacterial cell walls. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* **26**: 193-232.
- Weinberger, D.M., Harboe, Z.B., Sanders, E.A., Ndiritu, M., Klugman, K.P., Ruckinger, S., Dagan, R., Adegbola, R., Cutts, F., Johnson, H.L., et al. (2010). Association of serotype with risk of death due to pneumococcal pneumonia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. **51**: 692-699.
- Weinberger, D.M., Malley, R., y Lipsitch, M. (2011). Serotype replacement in disease after pneumococcal vaccination. *Lancet*. **378**: 1962-1973.
- Weiser, J.N. (2010). The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *J Mol Med. (Berl)* **88**: 97-102.
- Weiser, J.N., Austrian, R., Sreenivasan, P.K., y Masure, H.R. (1994). Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. *Infect Immun*. **62**: 2582-2589.
- 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.
- Weiser, J.N., Goldberg, J.B., Pan, N., Wilson, L., y Virji, M. (1998a). The phosphorylcholine epitope undergoes phase variation on a 43-kilodalton protein in *Pseudomonas aeruginosa* and on pili of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*. **66**: 4263-4267.
- Weiser, J.N., Lindberg, A.A., Manning, E.J., Hansen, E.J., y Moxon, E.R. (1989). Identification of a chromosomal locus for expression of lipopolysaccharide epitopes in *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*. **57**: 3045-3052.
- Weiser, J.N., Pan, N., McGowan, K.L., Musher, D., Martín, A., y Richards, J. (1998b). Phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* contributes to persistence in the respiratory tract and sensitivity to serum killing mediated by C-reactive protein. *J Exp Med*. **187**: 631-640.
- Weiser, J.N., Shchepetov, M., y Chong, S.T. (1997). Decoration of lipopolysaccharide with phosphorylcholine: a phase-variable characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun*. **65**: 943-950.
- Weycker, D., Strutton, D., Edelsberg, J., Sato, R., y Jackson, L.A. (2010). Clinical and economic burden of pneumococcal disease in older US adults. *Vaccine*. **28**: 4955-4960.
- WHO (2016). Chronic obstructive pulmonary disease (COPD). <http://www.who.int/respiratory/copd/en/>.
- WHO, W.H.O. (2008). 23-valent pneumococcal polysaccharide Vaccine.. WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* **83**: 373-384.
- Wilkinson, T.M., Hurst, J.R., Perera, W.R., Wilks, M., Donaldson, G.C., y Wedzicha, J.A. (2006). Effect of interactions between lower airway bacterial and rhinoviral infection in exacerbations of COPD. *Chest*. **129**: 317-324.
- Wills-Karp, M. (2007). Complement activation pathways: a bridge between innate and adaptive immune responses in asthma. *Proc Am Thorac Soc*. **4**: 247-251.
- Wood, D.E., y Salzberg, S.L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol*. **15**: R46.
- Xu, M., Struck, D.K., Deaton, J., Wang, I.N., y Young, R. (2004). A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**: 6415-6420.
- 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.
- Yamada, M., Watanabe, T., Miyara, T., Baba, N., Saito, J., Takeuchi, Y., y Ohsawa, F. (2007). Crystal structure of cefditoren complexed with *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 2X: structural basis for its high antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother*. **51**: 3902-3907.
- Yin, W., Ghebrehwet, B., Weksler, B., y Peerschke, E.I. (2008). Regulated complement deposition on the surface of human endothelial cells: effect of tobacco smoke and shear stress. *Thromb Res*. **122**: 221-228.
- Ying, S.C., Gewurz, A.T., Jiang, H., y Gewurz, H. (1993). Human serum amyloid P component oligomers bind and activate the classical complement pathway via residues 14–26 and 76–92 of the A chain collagen-like region of C1q. *J Immunol*. **150**: 169-176.
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R.R., Tuomanen, E., Dziarski, R., y Golenbock, D. (1999). Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol*. **163**: 1-5.
- Yother, J. (2011). Capsules of *Streptococcus pneumoniae* and other bacteria: paradigms for polysaccharide biosynthesis and regulation. *Annu Rev Microbiol*. **65**: 563-581.
- Yother, J., Forman, C., Gray, B.M., y Briles, D.E. (1982a). Protection of mice from infection with *Streptococcus pneumoniae* by anti-phosphocholine antibody. *Infect Immun*. **36**: 184-188.
- Yother, J., Leopold, K., White, J., y Fischer, W. (1998). Generation and properties of a *Streptococcus pneumoniae* mutant which does not require choline or analogs for growth. *J Bacteriol*. **180**: 2093-2101.
- Yother, J., Volanakis, J.E., y Briles, D.E. (1982b). Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. *J Immunol*. **128**: 2374-2376.

- Yother, J., y White, J.M. (1994). Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. *J Bacteriol.* **176**: 2976-2985.
- Yuste, J., Botto, M., Bottoms, S.E., y Brown, J.S. (2007). Serum amyloid P aids complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* **3**: 1208-1219.
- Yuste, J., Botto, M., Paton, J.C., Holden, D.W., y Brown, J.S. (2005). Additive inhibition of complement deposition by pneumolysin and PspA facilitates *Streptococcus pneumoniae* septicemia. *J Immunol.* **175**: 1813-1819.
- Yuste, J., Khandavilli, S., Ansari, N., Muttardi, K., Ismail, L., Hyams, C., Weiser, J., Mitchell, T., y Brown, J.S. (2010). The effects of PspC on complement-mediated immunity to *Streptococcus pneumoniae* vary with strain background and capsular serotype. *Infect Immun.* **78**: 283-292.
- Yuste, J., Sen, A., Truedsson, L., Jonsson, G., Tay, L.S., Hyams, C., Baxendale, H.E., Goldblatt, F., Botto, M., y Brown, J.S. (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.
- Zahner, D., y Hakenbeck, R. (2000). The *Streptococcus pneumoniae* beta-galactosidase is a surface protein. *J Bacteriol.* **182**: 5919-5921.
- Zalacain, R., Sobradillo, V., Amilibia, J., Barron, J., Achotegui, V., Pijoan, J.I., y Llorente, J.L. (1999). Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Resp J.* **13**: 343-348.
- Zarbock, A., y Rossaint, J. (2011). Regulating inflammation: ADAM8—a new player in the game. *Eur J Immunol.* **41**: 3419-3422.
- 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 acetylgllycerol that is the structural basis for 11A subtypes. *J Biol Chem.* **284**: 7318-7329.
- Zeisel, S.H. (2007). Gene response elements, genetic polymorphisms and epigenetics influence the human dietary requirement for choline. *IUBMB Life* **59**: 380-387.
- Zerbino, D.R., y Birney, E. (2008). Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* **18**: 821-829.
- Zhang, J.R., Idanpaan-Heikkila, I., Fischer, W., y Tuomanen, E.I. (1999). Pneumococcal *licD2* gene is involved in phosphorylcholine metabolism. *Mol Microbiol.* **31**: 1477-1488.
- 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 Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **65**: 757-761.
- Zipfel, P.F., Wurznner, R., y Skerka, C. (2007). Complement evasion of pathogens: common strategies are shared by diverse organisms. *Molecular immunology.* **44**: 3850-3857.



**IX. ANEXO I**



**Secuencia de nucleótidos de los nuevos alelos de *pce* analizados en este estudio<sup>a</sup>****>Alelo 19**

ATC AAAAAGAAATTAAGTAGTTAGCACTTGTAGGCGCTTTTTAGGTTTGTATGGTATGGGAATGTTTCAGGCTCAAGAAAGTTTCAG  
 GAAATAAAATCCACTTTATCAATGTTCAAGAAGGTGGCAGTGATGCGATTATCTTGAAAGCAATGGACATTTTGCCATGGTGGATAC  
 AGGAGAAGATATGATTTCCAGATGGAAGTGATTCTCGTTATCCATGGAGACAGGGTATTAATACCACTTATAAGCATGTTCTGACA  
 GACCGTGTCTTTTCGTCATTTGAAGGAATGGGTGTCCAAAACCTTGATTTTATTTTGGTGACCCATACCCACAGTGACCATATTTGGAA  
 ATGTTGATGAATTACTGTCTACCTATCCAGTTGACCGAGTCTATCTTAAAAATATAGTGATAATCGTATTACTAATCTGAACTGTCT  
 ATGGGATAAATCTGTACGGTTATGATAAGGTTTACAGACTGCTTCAGAAAAAGGTTTTCAGTTATTCAAAACATCACACAGGGAGAT  
 GCTCATTTCAGTTTGGGGACATGGATATCAACTCTATAACTATGAAAAAGAACCGATTATCAGGTGAATTAAGAAAAATTTGGG  
 ATGATAATCCAATTCCTTGATTAGTGTGGTAAAAGTCAATGGCAAGAAAAATTTACCTTGGGGGCGACTTAGATAATGTTTCAATGGAGC  
 AGAAGACAAGTACGGTCTCTCATTGAAAAAGTTGATTGATGAAGTTAATCATCACCATGATACCAACAAATCAATACCAAGGAT  
 TTTCAATAAAAATTTGAGTCCGAGTTGATTGTTCAAACCTCGGATAGTCTACCTTGGAAAAATGGTGTGATAGTAAAGCAAGGAT  
 GGCTCAAAGAACGAGGAATTGAGAGAATCAACGCAGCCAGCAAAGACTATGATGCAACAGTTTTTGGATATTCGACAAGACGGTTTTAGT  
 AAACATTTCAACTTCTACAGCCGATTCCAAGTTTTCAAGCTGGTTGGCATAAGAGTTCATATGAAAACTGGTATCAAGCGCCT  
 GATTCTACAGGAGAATAGTGTGCGTTGGAATGAAATTAAGGGTGAATGGTATTACTTTAACCAACCGGTATCTTATTACAGAATC  
 AATGGAAAAAATGGAAACAATCGTTGGTCTAATTTGACAGACTGCTGGTGTGCTGCTAAAAATTTGGAAGAAAAATCGCTGGATCTGGTA  
 TTATTTTAAACAAAGAAAACAGATGGAATTTGGTTGGATTCAAGATAAAGAGCAGTGGTATTATTTGGATGTTGATGGCTCTATGAAG  
 ACAGGTTGGCTTCAATATAAGGGGCAATGGTATTACTTTGCTCCATCAGGGGAAATGAAAACGGGCTGGGTAAAAGATAAAGAAGCCT  
 GGTACTATATGGATTCTACTGGTATCATGAAGACAGGTGAGATAGAAGTTGCTGGACATCATACTATCTAGAAGAATCAGGAGCTAT  
 GAAGCAAGGCTGGCTTAAAAGGCAAAATGATTGGTATTTCTACAAGACAGGTGGTTCAGAGCTATAGTTGGATTAAAGACAAGGAT  
 AAATGGTACTTCTTGAAGAAAATGGTCAATTACTTGTGAATGGTAAAGACACCAGAAGGCTATACTGTTGATTCAAGTGGTGCCTGGT  
 TAGTGGATGTTCCGATCGAGAAATCTGCTACAATTAACATATAAGTCAATTCAGAAATAAAGAAATCCAAAGAAGTGTGAAAAAGGA  
 TCTTGAAAAATAAAGAAACGAGTCAACATGAAAGTGTACAAAATCTTCAACTAGTCAAGATTTGACATCCTCAACTTCACAAAGCTCT  
 GAAACGAGTGTAAACAAATCGGAATCAGAACAGTAC

**>Alelo 20**

ATC AAAAAGAAATTAAGTAGTTAGCACTTGTAGGCGCTTTTTAGGTTTGTATGGTATGGGAATGTTTCAGGCTCAAGAAAGTTTCAG  
 GAAATAAAATCCACTTTATCAATGTTCAAGAAGGTGGCAGTGATGCGATTATCTTGAAAGCAATGGACATTTTGCCATGGTGGATAC  
 AGGAGAAGATATGATTTCCAGATGGAAGTGATTCTCGTATCCATGGAGAGAAGGAATTTGAAACGCTTTATAAGCATGTTCTGACA  
 GACCGTGTCTTTTCGTCATTTGAAGGAATGGGTGTCCAAAACCTTGATTTTATTTTGGTGACCCATACCCACAGTGATCATATTTGGAA  
 ATGTTGATGAATTACTGTCTACCTATCCAGTTGACCGAGTCTATCTTAAAGAAATATAGTGATAGTCTGATTTACTAATCTGAACTGTCT  
 ATGGGATAAATCTGTATGGCTATTATAAGGTTTACAGACTGCTGCAGAAAAAGGTGTTTCAGTTATTCAAAATATCACACAAGGGGAT  
 GCTCATTTCAGTTTGGGGACATGGATATTCAGCTCTATAAATATGAAAAAGAACTGATTATCAGGTTGATTAAGCAAGGATTTGGG  
 ATGACAATCCAATTCCTTGATTAGCGTGGTGAAGTCAATGGCAAGAAAAATTTACCTTGGGGGCGATTTAGATAATGTTTCAATGGAGC  
 AGAAGACAAGTATGGTCTCTCATTGAAAAAGTTGATTGATGAAGTTAATCATCACCATGATACCAATAAATCAATACCAAGGAT  
 TTCATTAATAAATTTGAGTCCGAGTTGATTGTTCAAACCTCGGATAGTCTACCTTGGAAAAATGGTGTGATAGTGAATGTTAAT  
 GGCTCAAAGAACGAGGAATTGAGAGAATCAACGCAGCCAGCAAAGACTATGATGCGACAGTTTTTGGATATTCGAAAGACGCTTTTGT  
 CAATATTTCAACATCCTACAAGCCTATTCCAAGTTTTCAAGCTGGTTGGCATAAGAGTTCATATGAAAACTGGTGGTATCAAGCGCCT  
 GATTCTACAGGAGAATATGCTGTTGGTTGGAATGAAATTAAGGGTGAATGGTATTACTTTAACCAACCGGTATCTTATTACAGAATC  
 AATGGAAAAAATGGAAACAATCGTTGGTCTAATTTGACAGACTGCTGGTGTGCTGCTAAAAATTTGGAAGAAAAATCGTTGGAATCTGGTA  
 TTATTTTAAACAAAGAAAACAGATGGAATTTGGTTGGATTCAAGATAAAGAGCAGTGGTATTATTTGGATGTTGATGGCTCTATGAAG  
 ACAGGTTGGCTTCAATATAAGGGGCAATGGTATTACTTTGCTCCATCAGGGGAAATGAAAACGGGCTGGGTAAAAGATAAAGAAGCCT  
 GGTACTATATGGATTCTACTGGTATCATGAAGACAGGTGAGATAGAAGTTGCTGGACATCATACTATCTAGAAGAATCAGGAGCTAT  
 GAAGCAAGGCTGGCTTAAAAGGCAAAATGATTGGTATTTCTACAAGACAGATGGTTCACGAGCTATAGTTGGATTAAAGACAAGGAT  
 AAATGGTACTTCTTGAAGAAAATGGTCAATTACTTGTGAATGGTAAAGACACCAGAAGGCTATAGTGTGGAATTTGAGTGGTGGT  
 TAGTGGATGTTCCGATCGAGAAATCTGCTACAATTAACATACAAGTCAATTCAGAAATAAAGAAATCCAAAGAAGTGTGAAAAAGGA  
 TCTTGAAAAATAAAGAAACGAGTCAACATGAAAGTGTACAAAATCTTCAACTAGTCAAGATTTGACATCCTCAACTTCACAAAGCTCT  
 GAAACGAGTGTAAACAAATCGGAATCAGAACAGTAC

**>Alelo 21**

ATC AAAAAGAAATTAAGTAGTTAGCACTTGTAGGCGCTTTTTAGGTTTGTATGGTATGGGAATGTTTCAGGCTCAAGAAAGTTTCAG  
 GAAATAAAATCCACTTTATCAATGTTCAAGAAGGTGGCAGTGATGCGATTATCTTGAAAGCAATGGACATTTTGCCATGGTGGATAC  
 AGGAGAAGATAGACGGTACGATTCTCGTATCCATGGAGAGAAGGAATTTGAAACGCTTTATAAGCATGTTCTAACAGACCGTGTCTTT  
 TCGTGTGTTGAAGGAATTTGGGTGTCCAAAACCTTGATTTTATTTTGGTGACCCATACCCACAGTGATCATATTTGAAATGTTGATGAA  
 TTACTGTCTACCTATCCAATTTGACCGAGTCTATCTTAAAGAAATATAGTGATAGTCTGATTTACTAATCTGAACTGTATGGGATAAAT  
 TGTATGGCTATGATAAGGTTTACAGACTGCTGCAGAAAAAGGTGTTTCAGTTATTCAAAATATCACACAAGGGGATGCTCATTTCAG  
 GTTTGGGGACATGGATATTCAGCTCTATAAATATGAAAAAGAACTGATTATCAGGTTGAAATTAAGAAAAATTTGGGATGACAATTC  
 AATTCCTTGATTAGCGTGGTGAAGTCAATGGCAAGAAAAATTTACCTTGGGGGCGATTTAGATAATGTTTCAATGGAGCAGAAGACAAGT  
 ATGTTCCCTCTCATTGGAAAAAGTTGATTGATGAAGTTAATCATCACCATGATACCAACAAATCAATACCAAGGATTTCAATAAAAA  
 TTTGAGTCCGAGTTTGGATTGTTCAAACCTCGGATAGTCTACCTTGGAAAAATGGTGTGATAGTGAATGTTAATTTGGCTCAAAGAA  
 CGAGGAATTGAGAGAATCAACGCAGCCAGCAAAGACTATGATGCAACAGTTTTTGGATATTCGAAAAGACGGTTTTTGTCAATATTTCAA  
 CATCTACAAGCCGATTCCAAGTTTTCAAGCTGGTTGGCATAAGAGTGCATATGGGAACGGTGGTATCAAGCGCCTGATTTCTACAG  
 AGATGATGCTGTGCGTTGGAAATGAAATCGAAGGTGAATGGTATTACTTTAACCAACCGGATCTTGTGTACAGAAATCAATGAAATTA  
 TGGAAACAATCATTTGGTCTATTGACAGACTCTGGTGTCTGCTAAAAATTTGGAAGAAAAATGATGGAATCTGGTATTATTTTAAACA  
 AAGAAAATCAGATGGAATTTGGTTGGGTTCAAGATAAAGAGCAGTGGTATTATTTGGATGTTGATGGTCTATGAAGACAGGATGGCT  
 TCAATATATTTGGGCAATGGTATTACTTTGCTCCATCAGGGGAAATGAAAAAGGCTGGGTAAAAGATAAAGAAACCTGGTACTATATG  
 GATTTACTGGTGTATGAAAGACAGGTGAGATAGAAGTTGCTGGTCAACATTTAATCTGGAAGATTCAGGACATGAAAGCAAGGCT  
 GGCATAAAAAGGCAAAATGATTGGTATTTCTACAAGACAGACGGTTACAGCTGTGGGTTGGATCAAGGACAAGGATAAATGGTACTTT  
 CTTGAAAGAAAATGGTCAATTACTTGTGAACGGTAAGACACCAGAAGGTTACTGTTGATTCAAGTGGTGCCTGGTATGTTGATGTT

TCGATCGAGAAATCTGCTACAATTAACACTACAAGTCATTCAGAAATAAAGAATCCAAAGAAGTAGTGAAAAGGATCTTGAAAATA  
 AAGAAACGAGTCAACATGAAAGTGTACAAATTCCTCAACTAGTCAAGATTTGACATCCTCAACTTCACAAAGCTCTGAAACGAGTG  
 TAAACAAATCGGAATCAGAACAGTAG

<sup>a</sup>Los tripletes marcados en fucsia corresponden a un codón de terminación pramaturu en la secuencia de los alelos.

**Secuencia de aminoácidos de los nuevos alelos de Pce analizados en este estudio**

>Alelo 12

MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTGEDYDFPDGSD  
 SRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVDELLSTYPVDRVYLKKYSDSR  
 ITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNITQGDAHFFQFGDMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSN  
 SLISVVKVNGKKIYLGGLDLDNVHGAEDKYGPLIGKVDLMKFNHHLDTKNSNTKNFIKNLSPEIIVQTSSS  
 PIGSYDSGQEIINREYISWLESMGIQHINAASKDYDATVFDIRQDGLINISTSYKPIPSFQAGWHKSSYGN  
 WWYQAPDSTGEYAVGWNEIKGEWYFNFQTGILLQNWKKWNNRWFYLTDSGVAAKNWKKIAGIWIWYFNKE  
 NQMEIGWIQDKEQWYLLDVGSMKTGWLQYKQWYFAPSGEMKTGWVKDKEAWYMDSTGIMKTGEIEV  
 AGHHYYLEESGAMKQGWKKANDWYFYKTDGSRVWGWIKDKDKWYFLKENGQLLVNGKTPEGYTVDSSGA  
 WLVDVSIKESATIKTTSHSEIKESKEVVKKDLENKETSQHESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVNKSESE  
 Q

**Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de los alelos de Pce analizados en este estudio<sup>a,b</sup>**

Alelo_7	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_2	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_16	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_1	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_4	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_9	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_10	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_17	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_11	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_18	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_15	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_3	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_8	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_13	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_14	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_5	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_6	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
Alelo_12	MKKKLTSLALVGAFGLGSWYGNVQAQESSGNKIHFINVQEGGSDAI ILESNGHFAMVDTG	60
	*****	
	●●	* * * * ● ●
Alelo_7	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_2	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_16	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_1	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELSVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_4	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELSVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_9	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELSVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_10	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELSVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_17	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_11	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_18	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_15	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_3	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120
Alelo_8	EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFIIVTHTHSDHIGNVD	120

Alelo\_13 EDYDFPDGSDSRYPWREIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFLVTHTHSDHIGNVD 120  
 Alelo\_14 EDYDFPDGSDSRYPWREIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFLVTHTHSDHIGNVD 120  
 Alelo\_5 EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFLVTHTHSDHIGNVD 120  
 Alelo\_6 EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFLVTHTHSDHIGNVD 120  
 Alelo\_12 EDYDFPDGSDSRYPWREGIETSYKHVLTDRVFRRLKELGVQKLDLFLVTHTHSDHIGNVD 120

\*\*\*\*\*:\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

● \*  
 Alelo\_7 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAETGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_2 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_16 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_1 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTATETGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_4 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTATETGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_9 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_10 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_17 ELLSTYPVDRVYLKKYSDNRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_11 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_18 ELLSTYPVDRVYLKKYSDNRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_15 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_3 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_8 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_13 ELLSTYPVDRVYLKKYSDNRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_14 ELLSTYPVDRVYLKKYSDNRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_5 ELLSTYPVDRVYLKKYSDNRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_6 ELLSTYPVDRVYLKKYSDNRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180  
 Alelo\_12 ELLSTYPVDRVYLKKYSDSRITNSERLWDNLYGYDKVLQTAAEKGVSVIQNIQTQGAHFQ 180

\*\*\*\*\*.\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*.\*\*\*\*\*

\* \*  
 Alelo\_7 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDN--SLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 238  
 Alelo\_2 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_16 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_1 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_4 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_9 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_10 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_17 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_11 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_18 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_15 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_3 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_8 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_13 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_14 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_5 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_6 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240  
 Alelo\_12 FGMDIQLYNYENETDSSGELKKIWDNNSLSLISVVKVNGKKIYLGGLDNVHGAEDKYG 240

\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

\*\* β12 → α6  
 Alelo\_7 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 294  
 Alelo\_2 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_16 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_1 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_4 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_9 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_10 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_17 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_11 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_18 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_15 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_3 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_8 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSDSL----PWKNGVDSEYVNWLK 296  
 Alelo\_13 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSSSPIGSYDSGQEIINREYISWLE 300  
 Alelo\_14 PLIGKVDLMKFNNHHHTNKSNTKDFIKNLSPLIVQTSSSPIGSYDSGQEIINREYISWLE 300



Alelo\_7 GVMKTGEIEVAGQHYYLEDSGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 534  
 Alelo\_2 GVMKTGEIEVAGQHYYLEDSGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_16 GVMKTGEIEVAGQHYYLEDSGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_1 GVMKTGEIEVAGQHYYLEDSGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_4 GVMKTGEIEVAGQHYYLEDSGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_9 GVMKTGEIEVAGQHYYLEDSGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_10 GVMKTGEIEVAGQHYYLEDSGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_17 GVMKTGEIEVAGHHYYLEESGAMKQGWLKKANDWYFYKTDGSRAIGWIKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_11 GIMKTGEIEVAGHHYYLEESGAMKQGWLKKANDWYFYKTDGSRAIGWIKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_18 GIMKTGEIEVAGHHYYLEESGAMKQGWLKKANDWYFYKTDGSRAIGWIKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_15 GIMKTGEIEVAGHHYYLEESGAMKQGWLKKANDWYFYKTDGSRAIGWIKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_3 GIMKTGEIEVAGHHYYLEESGAMKQGWLKKANDWYFYKTDGSRAIGWIKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_8 GIMKTGEIEVAGHHYYLEESGAMKQGWLKKANDWYFYKTDGSRAIGWIKDKDKWYFLKEN 536  
 Alelo\_13 GVMKTGEIEVAGQHYYLEDSGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 520  
 Alelo\_14 GVMKTGEIEVAGQHYYLEDSGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 540  
 Alelo\_5 GIMKTGEIEVAGHHYYLEESGAMKQGWLKKANDWYFYKTDGSRAIGWIKDKDKWYFLKEN 540  
 Alelo\_6 GIMKTGEIEVAGHHYYLEESGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 540  
 Alelo\_12 GIMKTGEIEVAGHHYYLEESGAMKQGWHKKANDWYFYKTDGSRAVGVKDKDKWYFLKEN 540  
 \*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*

Alelo\_7 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 594  
 Alelo\_2 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_16 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_1 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_4 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_9 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_10 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_17 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVPIEKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_11 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVPIEKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_18 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVPIEKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_15 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVPIEKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_3 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVPIEKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_8 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVPIEKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 596  
 Alelo\_13 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 580  
 Alelo\_14 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 600  
 Alelo\_5 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVPIEKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 600  
 Alelo\_6 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 600  
 Alelo\_12 QQLLVNGKTPEGYTVDSSGAWLVDVSIKESATIKTTSHEIKESKEVVKKDLNENKETSQH 600  
 \*\*\*\*\*

Alelo\_7 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 625  
 Alelo\_2 ESVTNFSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_16 ESVTNFSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_1 ESVTNFSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_4 ESVTNFSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_9 ESVTNFSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_10 ESVTNFSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_17 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_11 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_18 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_15 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_3 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_8 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 627  
 Alelo\_13 ESVTNFSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 611  
 Alelo\_14 ESVTNFSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 631  
 Alelo\_5 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 631  
 Alelo\_6 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 631  
 Alelo\_12 ESVTNSSTSQDLTSSTSQSSETSVKNKSESEQ 631  
 \*\*\*\*\*

<sup>a</sup>\*, residuos implicados en la unión al Zn<sup>2+</sup>; ●, residuos implicados en la unión al Ca<sup>2+</sup>

<sup>b</sup> 25 aa del péptido señal; 312 aa del dominio catalítico; 205 aa del CBD; 85 aa de la cola C-terminal.

**Secuencia de aminoácidos de los nuevos alelos de Ply analizados en este estudio**

>Alelo 21

MANKAVNDFILAMNYDKKKLLTHQGESIENRFIKEGNQLPDEFVVIERKKRSLSTNTSDISVTATNDSRL  
YPGALLVVDETLLENNPTLLAVDRAPMTYSIDLPLGLASSDSFLQVEDPSNSSVRGAVNDLLAKWHQDYGO  
VNNVPARMQYEKITAHSMEQLKVKFGSDFEKTGNSLDIDFNSVHSGEKQIQIVNFKQIYYTVSVDVAVKNP  
GDVFDQDTVTVEDLKQRGISAERPLVYISSVAYGRQVYLKLETTSKSDEVEAAFEALIKGVKIAPQTEWKQ  
ILDNTEVKAVILGGDPSSGARVVTGKVDMVEDLIQEGSRFTADHPGLPISYTTSF LRDNVVATFQNSTDY  
VETKVTAYRNGDLLLDHSGAYVAQYYITWNELSYDHQGEVLT PKAWDRNGQDLTAHF TT SIPLKGNVRN  
LSVKIRECTGLAWEWWRTVYEKTDLPLVRKRTISIWGTTLYPQVEDKVEND

## **X. ANEXO II**



## ANEXO II

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

- Aguinagalde, L., Corsini, B., Domenech, A., Domenech, M., Cámara, J., Ardanuy, C., García, E., Liñares, J., Fenoll, A., y Yuste, J. (2015). Emergence of amoxicillin-resistant variants of Spain9V-ST156 pneumococci expressing serotype 11A correlates with their ability to evade the host immune response. *PloS one*. **10**: e0137565.
- Corsini, B., Aguinagalde, L., Ruiz, S., Domenech, M., Antequera, M.L., Fenoll, A., García, P., García, E., y Yuste, J. (2016). Immunization with LytB protein of *Streptococcus pneumoniae* activates complement-mediated phagocytosis and induces protection against pneumonia and sepsis. *Vaccine*. **34**: 6148-6157.

