UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



ESCUELA DE DOCTORADO DE LA UNIVERSIDAD DE CANTABRIA DOCTORADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOMEDICINA

TESIS DOCTORAL

INTERACCIONES CLAVE HOSPEDADOR-PATÓGENO EN ESPECIE DE *Acinetobacter* DE RELEVANCIA CLÍNICA

Presentada por: MARÍA LÁZARO DÍEZ

Dirigida por: Dr. JOSÉ RAMOS VIVAS Dr. MARCOS LÓPEZ HOYOS

Santander. Septiembre de 2018



José Ramos Vivas, Investigador del grupo de Epidemiología y Mecanismos Patogénicos y Moleculares de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL) y Marcos López Hoyos, Jefe del Servicio de Inmunología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y responsable del grupo de Inmunología del Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL)

CERTIFICAN: que María Lázaro Díez, Egresada en Biotecnología, ha desarrollado bajo nuestra dirección la Tesis Doctoral titulada **"Interacciones clave hospedador-patógeno en especies de** *Acinetobacter* **de relevancia clínica"**.

Consideramos que el trabajo es original y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad de Cantabria.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como director de la mencionada Tesis Doctoral.

Santander. Septiembre de 2018

Fdo: José Ramos Vivas

Fdo: Marcos López Hoyos

La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida de los siguientes proyectos de investigación:

- Interacciones clave hospedador patógeno en especies de *Acinetobacter* de relevancia clínica. 2013-2016. Instituto de Salud Carlos III. FIS, PI13/01310. I.P: Dr. José Ramos Vivas.
- **Biología integrada de la infección y la resistencia antimicrobiana de** *Acinetobacter baumannii* y *A. pittii.* 2016-2019. Instituto de Salud Carlos III. FIS, PI16/01103. I.P: Dr. José Ramos Vivas.
- Contrato predoctoral en el área de la Biomedicina, Biotecnología y Ciencias de la Salud. 2016-2018. IDIVAL y Universidad de Cantabria. PREVAL, 16/05. I.P: Dr. José Ramos Vivas.

A mi familia A mis amigos A Alejandro

"Las ganas de inventar y una tiza al cielo marcarán la frontera de mi razón" Vetusta morla

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que después de tanto tiempo, esfuerzo, buenos y malos momentos hayamos llegado hasta aquí. Hablo en plural porque este trabajo, lo que he aprendido científica y personalmente, no podría haber sido posible sin vosotros.

No podría empezar por otra persona que no sea José, mi director. Gracias por enseñarme que lo más importante en esta profesión son las ganas y por inculcarme el entusiasmo por hacer cada día una cosa nueva. Gracias por compensar la negatividad que a veces me caracteriza, por aceptar mi carácter difícil en algunas ocasiones, por la confianza que has depositado en mí desde el primer momento y por todo lo que me has enseñado y apoyado.

A mi codirector, el Dr. Marcos López Hoyos, gracias por haberme dado su apoyo en el momento en que lo necesitaba sin apenas conocerme y por aportar su visión en las cuestiones inmunológicas de la tesis.

A Sara, por haberme enseñado casi todo lo que he hecho en estos años, por haberme inculcado la importancia del rigor y del esfuerzo en este trabajo. Gracias por tu paciencia, desde el principio hasta hoy escuchándome día a día. Te has convertido en un apoyo fundamental en mi vida y sin ti es muy probable que esta tesis no hubiera existido. Gracias.

Y cómo olvidar a mi compi de batallas, Itziar. Llevamos ya unos añitos aguantándonos mutuamente y no creo que tenga palabras para agradecer todo lo que has hecho por mí. Gracias por haberte preocupado de sacar este trabajo adelante como si fuera tuyo, por apoyarme en los malos momentos y celebrar conmigo los buenos.

Quiero agradecer también su aportación a la gente que ha pasado por el laboratorio a lo largo de estos años. En especial a Tere, Zaloa y Carlota.

Y el siguiente apartado es para las chicas que han me han hecho la vida mucho más fácil con las comidas, los cafés y las quedadas fuera del trabajo. Gracias a mi segunda madre, Olgui, por tener siempre un abrazo preparado para mí. A mi "hermana" Vero, por ser tan auténtica y sacarme siempre una sonrisa. A Fer, que con su sonrisa y su buen humor me ha transmitido siempre tanta positividad. A Raquel, por compartir las bromas de bajitas conmigo (y alguna otra más) con buen humor. A Bego, por su apoyo continuo y sus doodles para hacer posibles las quedadas. A Leti, la nueva incorporación lebaniega, por darnos siempre tanta alegría con tu espontaneidad. A V. Pulito, otra sonrisa de las que te alegran el día. Muchas gracias a todas, espero teneros siempre en mi vida.

Gracias al servicio de Micro, en especial a Marta, Alain, Laura, Cata y Mariaje, por haber tenido siempre una palabra de ánimo para mí.

Gracias a Inés por su generosidad a la hora de sacar sangre siempre que lo he necesitado sin importar el día ni la hora. Gracias también a todos los donantes de sangre.

A Fidel por su ayuda con la microscopía y por hacer más amenas las horas en el confocal. A J.M. Icardo por las imágenes de SEM.

A Agus, mi compañero de piso estos años pero mucho más. Gracias por aguantar mis quejas del labo después de las jornadas infinitas y por ayudarme a hacer la vida mucho más divertida.

No puedo pasar este momento sin acordarme de mis compis de clase, mis "Biofrikis". Gracias por enseñarme que "El descanso de mi vida se lo debo a la universidad" por mucho tiempo que pase. En especial, gracias a Silvi, Vicky, Ele, Cris, Moni, Natalia, Curry y Ester que habéis hecho este tiempo mucho más divertido pensando en la próxima quedada o el próximo Sonorama, por sacar siempre mi mejor versión. Gracias a Isa por alegrar las visitas Madrid-Santander.

A mis amigas de siempre por estar ahí toda la vida y también en esta fase. A Lara, Pir, Clau, Marta, Lari y Rebe. Por interesaros por mi trabajo y dar siempre alegría a mi vida. Estoy muy orgullosa de las personas en que nos estamos convirtiendo y de que sigamos juntas en cada etapa de la vida.

A Lucía por todos los momentos que hemos compartido estos años (tantos que sería imposible mencionarlos), gracias por estar siempre ahí para lo bueno y lo malo, eres imprescindible. A Carmen, Babi, Elena y Marina, gracias por apoyarme en todo momento y darme tantas alegrías durante estos años, aunque no hace tanto que conozco, tengo la certeza de que estaréis ahí para siempre.

A Laura, Denys por cada verano y cada momento juntas, que siempre es especial. A Vanessa por entenderme siempre en lo científico y en lo personal.

A todos mis tíos por interesarse siempre por mi trabajo, en especial a mi tío Beni por el apoyo en un momento clave. Gracias también mis primos.

A mis abuelos. A Paco, porque aunque no le conocí, tus libros de genética fueron la mejor herencia. A Chicho por llenar de recuerdos y sonrisas los cuatro primeros años de mi vida. A mi abuela Rosi, por su bondad, por confiar y creer en mí hasta el último día, no sabes cuánto te echo de menos. A mi abuela Aurora, por llenar mi vida, por apoyarme, por todo su cariño y su orgullo, esto es también tuyo.

A mi hermana por ser una persona crucial en mi vida y siempre estar ahí. Eres un ejemplo de esfuerzo y valor. Gracias.

A mis padres, los pilares de mi vida. Gracias por enseñarme que para lograr tus objetivos el principal compañero es el esfuerzo. Gracias por inculcarme que lo más importante era que tuviera una opinión propia, aunque fuera diferente a la vuestra. Gracias por dejarme equivocarme. Gracias por todos vuestros esfuerzos para que pudiera estudiar lo que me iba a hacer feliz. Gracias por aplicar la dosis exacta de cariño, disciplina y educación en mí. Esto es más vuestro que mío.

Y por último, a Alejandro. Gracias por aparecer en este camino y hacer que ya no quiera recorrerlo sin ti. Gracias por todo tu apoyo, tu confianza en mí (a veces creo que exagerada), tu cariño y por 'mil razones' más. No creo que hubiera podido llegar hasta aquí sin ti (o al menos no en un estado mental razonable).

ÍNDICE

1. Índice de contenidos

| ÍNDICE | 3 |
|---|----|
| 1. Índice de contenidos | 3 |
| 2. Índice de tablas | 8 |
| 3. Índice de figuras | 9 |
| | |
| ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS | 13 |
| | |
| RESUMEN/ABSTRACT | 19 |
| 1. Resumen | 19 |
| 2. Abstract | 21 |
| | |
| INTRODUCCIÓN | 25 |
| 1. Acinetobacter | 25 |
| 1.1. Origen y taxonomía | 25 |
| 1.2. Características morfológicas y hábitats | 28 |
| 1.3. Métodos de identificación de especies | 29 |
| 1.3.1. Métodos fenotípicos | 29 |
| 1.3.2. Métodos genotípicos | 29 |
| 1.4. Infecciones causadas por Acinetobacter | 31 |
| 1.5. Transmisión de Acinetobacter | 33 |
| 1.6. Resistencia a antibióticos | 34 |
| 1.6.1. Genética de la resistencia en Acinetobacter spp. | 34 |
| 1.6.2. Mecanismos de resistencia | 35 |
| 1.6.2.1. Resistencia a β-lactámicos | 35 |
| 1.6.2.2. Resistencia a aminoglicósidos | 37 |
| 1.6.2.3. Resistencia a quinolonas | 38 |
| 1.6.2.4. Resistencia a tetraciclinas y glicilciclinas | 38 |
| 1.6.2.5. Resistencia a polimixinas | 38 |

| 1.7. Factores de virulencia | 39 |
|--|----|
| 2. Interacción de Acinetobacter con células epiteliales | 43 |
| 3. Respuesta inmunitaria frente a Acinetobacter | 44 |
| 4. Neutrófilos | 45 |
| 4.1. Características de los neutrófilos | 45 |
| 4.2. Activación de los neutrófilos | 47 |
| 4.3. Eliminación de patógenos: degranulación, fagocitosis y NETosis | 49 |
| 4.3.1. Degranulación | 49 |
| 4.3.2. Fagocitosis | 50 |
| 4.3.3. NETs | 52 |
| 4.3.3.1 Cuantificación de las NETs experimentalmente | 54 |
| 4.4. Interacción con otras células del sistema inmunitario | 56 |
| JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 61 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 65 |
| 1. Cepas bacterianas | 65 |
| 1.1. Condiciones de cultivo y conservación | 65 |
| 1.2. Caracterización morfológica de las cepas de Acinetobacter | 67 |
| 1.2.1. Producción de anticuerpos policlonales contra Acinetobacter | 67 |
| 1.2.2. Inmunofluorescencia | 68 |
| 1.2.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) | 69 |
| 1.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM) | 70 |
| 2. Interacción de Acinetobacter baumannii y A. pittii con células epiteliales A549 | 71 |
| 2.1. Cultivo y propagación de la línea celular A549 | 71 |
| 2.2. Adherencia e internalización de Acinetobacter en células A549 | 71 |
| 2.2.1. Cultivo de células A549 | 71 |
| 2.2.2. Cultivo bacteriano | 72 |
| 2.2.3. Infecciones experimentales | 72 |
| 2.3. Citotoxicidad de productos extracelulares de Acinetobacter en células A549 | 75 |
| 2.3.1. Cultivo de células A549 | 75 |

| 2.3.2 Cultivo hacteriano | 75 |
|--|----------|
| 2.2.2. Enseve de siteterioided | 75 |
| 2.5.5. Elisayo de choloxicidad | 75 77 |
| 3. Interacciones Actnetobacter-celulas del sistema ininunitario | 77 |
| 3.1. Neutrofilos | // |
| 3.1.1. Aislamiento de neutrófilos humanos procedentes de sangre | |
| 3.1.2. Infecciones experimentales | 78 |
| 3.1.3. Fagocitosis | 78 |
| 3.1.3.1. Cuantificación de bacterias viables durante la fagocitosis | 78 |
| 3.1.3.2. Ensayos de inmunofluorescencia | 79 |
| 3.1.3.3. SEM | 80 |
| 3.1.3.4. Viabilidad de bacterias en los neutrófilos: tinción Live/Dead | 80 |
| 3.1.3.5. Microscopía de célula viva | 81 |
| 3.1.4. NETs | 82 |
| 3.1.4.1. Observación de NETs por inmunofluorescencia | 82 |
| 3.1.4.2. Observación de NETs por microscopía de célula viva | 82 |
| 3.1.4.3. Cuantificación de NETs mediante SYTOX Green | 83 |
| 3.1.4.4. Cuantificación de EN | 83 |
| 3.1.4.5. Cuantificación de histona H3 citrulinada | 85 |
| 3.1.5. Expresión génica en neutrófilos | 86 |
| 3.1.5.1. Extracción del ARN en neutrófilos | 86 |
| 3.1.5.2. Cuantificación del ARN | 87 |
| 3.1.5.3. Eliminación de ADNg y retrotranscripción | 87 |
| 3.1.5.4. Matrices de q-PCR | 88 |
| 3.1.5.5. Análisis estadístico | 92 |
| 3.2. Macrófagos | 94 |
| 3.2.1. Línea celular J774A.1 | 94 |
| 3.2.1.1. Cultivo, propagación y almacenamiento de la línea celular J774A.1 | 94 |
| 3.2.1.2. Infecciones experimentales | 94 |
| 3.2.1.3. Ensayos de inmunofluorescencia | 95 |
| 3.2.2. Aislamiento y diferenciación de macrófagos de sangre humana | 95 |

| RESULTADOS | 99 |
|--|-----|
| 1. Caracterización morfológica de Acinetobacter baumannii y A. pittii | 99 |
| 1.1. Inmunofluorescencia | 99 |
| 1.2. SEM y TEM | 100 |
| 2. Interacción de Acinetobacter baumannii y A. pittii con células epiteliales A549 | 101 |
| 2.1. Adherencia de Acinetobacter a las células A549 | 101 |
| 2.2. Internalización de Acinetobacter en células A549 | 105 |
| 2.3. Citotoxicidad de Acinetobacter en las células A549 | 107 |
| 3. Interacciones Acinetobacter-células del sistema inmunitario | 109 |
| 3.1. Neutrófilos | 109 |
| 3.1.1. Fagocitosis | 109 |
| 3.1.2. NETs | 114 |
| 3.1.2.1. Observación de NETs por microscopía | 114 |
| 3.1.2.2. Cuantificación de NETs | 118 |
| 3.1.3. Estudios de expresión génica en neutrófilos | 119 |
| 3.2. Macrófagos | 123 |
| 3.2.1. Infecciones en células J774A.1 | 123 |
| 3.2.2. Infecciones en macrófagos humanos | 123 |
| | |
| DISCUSIÓN | 127 |

| 1. Caracterización morfológica de Acinetobacter baumannii y A. pittii | 127 |
|---|-----|
| 2. Interacción de Acinetobacter spp. con células epiteliales | 128 |
| 2.1. Adherencia de Acinetobacter spp. a células epiteliales A549 | 128 |
| 2.2. Internalización de Acinetobacter spp. en células A549 | 130 |
| 2.3. Citotoxicidad de Acinetobacter sobre las células A549 | 131 |
| 3. Interacciones Acinetobacter-células del sistema inmunitario | 132 |
| 3.1. Neutrófilos | 132 |
| 3.1.1. Fagocitosis | 132 |
| 3.1.2. NETs | 135 |
| 3.1.3. Expresión génica en neutrófilos infectados con Acinetobacter | 137 |
| 3.2. Macrófagos | 141 |

| 4. Limitaciones del estudio y perspectivas futuras | 142 |
|---|-----|
| CONCLUSIONES | 147 |
| REFERENCIAS | 151 |
| | |
| ANEXOS | 167 |
| 1. Explicación de los vídeos (Soporte digital) | 167 |
| 2. Resultados del análisis de expresión génica | 169 |
| 3. Publicaciones derivadas directamente de la presente la tesis doctoral | 197 |
| Acinetobacter baumannii and A. pittii clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro | 197 |
| Human neutrophils phagocytose and kill Acinetobacter baumannii and A. pittii | 211 |

2. Índice de tablas

| Tabla 1. Especies de Acinetobacter validadas | 25 |
|--|-----|
| Tabla 2. Tipos y composición de los gránulos de los neutrófilos | 49 |
| Tabla 3. Características diferenciales entre NETosis suicida y NETosis vital | 53 |
| Tabla 4. Citocinas producidas por neutrófilos humanos | 56 |
| Tabla 5. Cepas bacterianas de Acinetobacter utilizadas | 65 |
| Tabla 6. Cepas utilizadas como control | 65 |
| Tabla 7. Composición del medio Luria | 66 |
| Tabla 8. Composición del medio Mueller Hinton | 66 |
| Tabla 9. Composición del medio BHI | 66 |
| Tabla 10. Composición del medio AS | 67 |
| Tabla 11. Concentraciones de la recta patrón del estándar del "NET Assay" | 84 |
| Tabla 12. Concentraciones de la recta patrón del estándar de histona H3 citrulinada | 85 |
| Tabla 13. Genes analizados en la matriz de q-PCR | 88 |
| Tabla 14. Condiciones de los ciclos de q-PCR | 91 |
| Tabla 15. Genes sobreexpresados y reprimidos en los experimentos de expresión génica | 121 |
| Tabla 16. Genes sobreexpresados de una manera estadísticamente significativa | 122 |

3. Índice de figuras

| Figura 1. Morfología de Acinetobacter | 28 |
|---|-----|
| Figura 2. Características morfológicas de los neutrófilos | 45 |
| Figura 3. Activación de los neutrófilos | 48 |
| Figura 4. NETs | 52 |
| Figura 5. Tinción de Acinetobacter | 99 |
| Figura 6. Inmunofluorescencias cruzadas | 99 |
| Figura 7. Morfología de las cepas analizadas por microscopía electrónica | 100 |
| Figura 8. Experimentos de adherencia y recuento de UFCs en Acinetobacter spp. | 101 |
| Figura 9. Adherencia de las diferentes cepas a las células A549 | 102 |
| Figura 10. Adherencia de C. striatum a células A549 | 103 |
| Figura 11. Efecto del medio de cultivo en la adherencia de Acinetobacter a las células A549 | 104 |
| Figura 12. Inmunofluorescencia doble de Acinetobacter en células A549 | 105 |
| Figura 13. Ensayos de protección con gentamicina | 106 |
| Figura 14. Citotoxicidad de ECPs de Acinetobacter | 107 |
| Figura 15. Citotoxicidad de S. liquefaciens | 108 |
| Figura 16. Análisis de inmunofluorescencia mitocondrial de la monocapa de células A549 | 108 |
| Figura 17. Contacto y fagocitosis de Acinetobacter en neutrófilos humanos | 110 |
| Figura 18. Ensayo de protección con gentamicina en neutrófilos | 111 |
| Figura 19. Tinción Live/Dead en neutrófilos no fijados | 112 |
| Figura 20. Captura y fagocitosis de Acinetobacter por neutrófilos humanos | 113 |
| Figura 21. Efecto del pretratamiento de neutrófilos humanos con citocalasina D | 114 |
| Figura 22. Producción de NETs por parte de neutrófilos humanos infectados con Acinetobacter | 115 |
| Figura 23. Análisis de inmunofluorescencia de las NETs (i) | 116 |
| Figura 24. Análisis de inmunofluorescencia de las NETs (ii) | 117 |
| Figura 25. Análisis de las NETs con SYTOX Green | 118 |
| Figura 26. Medida de la histona H3 citrulinada y EN | 119 |
| Figura 27. Expresión de genes de la ruta Toll | 120 |
| Figura 28. Interacción de macrófagos J774A.1 con Acinetobacter | 123 |
| | |

Figura 29. Inmunofluorescencia del co-cultivo de macrófagos y neutrófilos humanos infectados por *Acinetobacter*

124

ÅBREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SÍMBOLOS

| Símbolo | Significado |
|------------------|--|
| ACB | Acinetobacter calcoaceticus- Acinetobacter baumannii |
| ADC | Cefalosporinasas derivadas de Acinetobacter |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| ADNg | Ácido desoxirribonucleico genómico |
| AFLP | Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados |
| ARDRA | Análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNr | Ácido ribonucleico ribosómico |
| AS | Agar sangre |
| ATCC | Colección Americana de Cultivo Tipo |
| B2M | β-2-microglobulina |
| BHI | Infusión de cerebro-corazón |
| BLEEs | β-lactamasas de espectro extendido |
| BPI | Proteína bactericida que incrementa la permeabilidad |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| Ca ⁺² | Ion calcio |
| CCL2 | Ligando de quimiocina 2 |
| CCL3 | Ligando de quimiocina 3 |
| CCL19 | Ligando de quimiocina 19 |
| CCL20 | Ligando de quimiocina 20 |
| CDs | Células dendríticas |
| CEIC | Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria |
| CFUs | Colony forming units |
| CG | Catepsina G |
| CLSI | Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| cm ² | Centímetro cuadrado |
| CO_2 | Dióxido de carbono |
| COX-2 | Ciclooxigenasa 2 |
| CPs | Polisacáridos capsulares |
| CS | Corynebacterium striatum |
| Ct | Ciclo umbral o "threshold" |
| CXCL8 | Ligando de quimiocina 8 con motivo C-X-C |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| DMEM | Medio Dulbecco Eagle Modificado |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| D.O. | Densidad óptica |
| ECPs | Productos extracelulares |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| EMA | Enzima modificante de aminoglicósido |
| EPOC | Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica |
| ERK | Quinasas reguladas por señales extracelulares |

| EN | Elastasa de neutrófilos |
|-----------|--|
| FBS | Suero fetal bovino |
| Fc | Fracción constante de la inmunoglobulina |
| FcγR | Receptor de la región constante γ |
| fMLP | Fonnil-metionil-leucil-fenilalanina |
| G | Gentamicina |
| g | Fuerza centrífuga relativa o fuerza g |
| g | Gramos |
| G+C | Guanina y citosina |
| G-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos |
| GAPDH | Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa |
| GM-CSF | Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos |
| GDI | Gen de interés |
| h | Hora |
| hCAP18 | Catelicidina humana |
| H-P | Hospedador-patógeno |
| HRP | Peroxidasa de rábano picante |
| HUMV | Hospital Universitario Marqués de Valdecilla |
| ICAM-1 | Molécula de adhesión intercelular 1 |
| IFN-γ | Interferón y |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IL-1β | Interleucina 1 β |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| IL-17 | Interleucina 17 |
| IMP | β-lactamasa hidrolizante de imipenem |
| IRAK | Quinasa asociada al receptor de la interleucina 1 |
| ITUs | Infecciones del tracto urinario |
| ΙκΒ | Inhibidor κ β |
| kV | Kilovatio |
| 1 | Litro |
| LA | Medio Luria suplementado con agar |
| LFA-1 | Antígeno de función linfocitaria αLβ2 1 |
| LL-37 | Proteína catelicidina |
| LMG | Colección de Microorganismos Belga Coordinada |
| LPS | Lipopolisacárido |
| М | Molar |
| Mac-1 | Antígeno de macrófagos 1 |
| MALDI-TOF | Espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistida por matriz |
| MAPK | Proteínas quinasas activadas por mitógenos |
| MDR | Multirresistente |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |

| MOI | Multiplicidad de infección |
|----------------|--|
| MPO | Mieloperoxidasa |
| mU | Mili-unidad de actividad enzimática |
| N/A | Unidades de apertura numérica |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| NETs | Trampas extracelulares de neutrófilos |
| ΝΓκΒ | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| ng | Nanogramos |
| NGAL | Gelatinasa de neutrófilos asociada a lipocalina |
| NK | Células "natural killers" |
| nm | Nanómetro |
| nM | Nanomolar |
| n° | Número |
| O/N | Durante la noche |
| °C | Grados centígrados |
| OMPs | Proteínas de membrana externa |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| OMVs | Vesículas de membrana externa |
| OXA | Oxacilinasa |
| PAD4 | Peptidil arginasa deaminasa |
| PAMP | Patrón asociado a patógeno |
| PBP | Proteína de unión a penicilina |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PCR/ESI-MS | PCR acoplada a ionización por electrospray, la |
| | espectrometría de masas |
| PDR | Panresistente |
| PFA | Paraformaldehído |
| PI3K | Fosfoinositol-3-quinasa |
| PMA | Forbol 12-miristato 13-acetato |
| PMN | Polimorfonuclear |
| PR 3 | Proteinasa 3 |
| PSGL-1 | Glicoproteína ligando 1 de P-selectina |
| PTSG-2 | Prostaglandina-endoperoxida sintasa 2 |
| q-PCR | PCR cuantitativa |
| QS | Quorum-sensing |
| RND | Resistencia de división de nodulación |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT | Temperatura ambiente |
| S | Segundos |
| SD | Desviación estándar |
| SE | Error estándar |
| SEM | Microscopía electrónica de barrido |
| Т | Tritón |
| T ^a | Temperatura |

| TEM | Microscopía electrónica de transmisión |
|-------------------|---|
| Th | Linfocito T colaborador |
| TLRs | Receptores de tipo Toll |
| TMB | 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina |
| TNF-α | Factor de necrosis tumoral α |
| U | Unidad de actividad enzimática |
| UCI | Unidad de Cuidados Intensivos |
| UE | Unión Europea |
| UFCs | Unidades formadoras de colonias |
| v/v | Volumen/volumen |
| VIM | Metalo-β-lactamasa codificada por integrón Verona |
| WHO | World Health Organization |
| XDR | Extremadamente resistente |
| Y cols. | Y colaboradores |
| ΔCt | Delta Ct |
| $\Delta\Delta Ct$ | Doble delta Ct |
| μg | Microgramo |
| μl | Microlitro |
| μm | Micrómetro |
| μΜ | Micromolar |
| | |

RESUMEN

1. Resumen

Acinetobacter es un género compuesto por bacterias Gram-negativas del que forman parte más de 50 especies validadas. Aunque la mayoría están presentes en el ambiente, en los últimos años han emergido algunas de ellas como importantes patógenos nosocomiales, causantes de enfermedades intrahospitalarias, tan importantes como neumonías o bacteriemias. La especie patógena más importante hasta la fecha es *A. baumannii*. Sin embargo, existen otras, como *A. pittii* o *A. nosocomialis*, que también han adquirido importancia clínica.

Existen dos principales problemas a la hora de enfrentarse a las infecciones causadas por estos microorganismos. Por un lado, tienen una gran capacidad de sobrevivir en ambientes adversos, resistiendo a condiciones de desecación y de ausencia de nutrientes, lo que aumenta su persistencia en el ambiente hospitalario. Por otro lado, estas bacterias cuentan con una gran propensión a desarrollar resistencia a antibióticos. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha situado a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos en cabeza de la lista de patógenos con prioridad crítica para la búsqueda de nuevos antibióticos, debido a que ya se han encontrado cepas resistentes a todos los antimicrobianos conocidos. Aunque la resistencia antibiótica y la epidemiología de la especie *A. baumannii* han sido ampliamente estudiadas, otros aspectos clave como los factores de virulencia o la interacción con células del hospedador precisan estudios más detallados en esta especie y permanecen prácticamente inexplorados en otras de relevancia clínica como *A. pittii*.

Por ello, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la interacción hospedador-patógeno (H-P) en especies del género *Acinetobacter* de relevancia clínica, en especial, la interacción de estos microorganismos con células epiteliales y con neutrófilos.

En cuanto a las células epiteliales, se utilizó la línea celular de adenocarcinoma humano A549. Tras diversos ensayos de microscopía y de recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs) se encontró que, en las condiciones utilizadas, las cepas no presentaron adherencia, internalización ni citotoxicidad hacia este tipo celular.

En el caso de los neutrófilos se observó, por medio de microscopía confocal y videomicroscopía, una fagocitosis activa con muerte de las bacterias en el interior de estos fagocitos. Por otro lado, a partir de las cuatro horas de infección, se produjo, en algunos casos, la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) por parte de neutrófilos

estimulados con *Acinetobacter* spp., fenómeno que fue comprobado mediante inmunofluorescencia, cuantificación del ADN y de proteínas propias de las NETs, como la elastasa de neutrófilos (EN) y la histona H3 citrulinada. Además, al analizar la expresión génica de los neutrófilos infectados con *A. baumannii* durante dos horas, se comprobó la activación de estas células, al observar una sobreexpresión estadísticamente significativa de varios genes codificantes de proteínas de naturaleza proinflamatoria, como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFkB), la interleucina 1- β (IL-1 β) o la interleucina-8 (IL-8). Estos resultados indican que los neutrófilos son un tipo celular clave en el control de la infección por *Acinetobacter*.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral respecto a la interacción de células del hospedador con *Acinetobacter* han permitido aumentar el conocimiento acerca de los mecanismos de patogenicidad de estas bacterias y la respuesta del organismo a su infección.

2. Abstract

Acinetobacter is a genus of Gram-negative bacteria composed by more than 50 validated species. Although most of them are environmental species, in the last years, some species have emerged as important nosocomial pathogens, causing diseases as important as pneumonia or bacteremia. Nowadays, the most important pathogen specie is *A. baumannii*. However, there are others such as *A. pittii* or *A. nosocomialis* that have also acquired clinical importance.

The main problems when dealing with the infections caused by these microorganisms are the following. On the one hand, they have a great ability to survive in adverse environments, resisting desiccation conditions and starvation, which increases their persistence in the hospital environment. On the other hand, these bacteria have a great propensity to develop resistance to antibiotics. In fact, World Health Organization (WHO) sited *A. baumannii* resistant to carbapenems in the top of the list of clinical priority for searching new antibiotics, since strains resistant to all antibiotics used in the clinic have already been found. Although both antibiotic resistance and epidemiology of the *A. baumannii* species have been widely studied, other key aspects such as virulence factors or interaction with host cells require deeper studies in these species, and remain practically unexplored in others of clinical relevance as *A. pittii*.

Therefore, the objective of the present work was to study the host-pathogen interaction in *Acinetobacter* spp. of clinical relevance, especially the interaction of these microorganisms with epithelial cells and neutrophils.

Concerning epithelial cells, the human adenocarcinoma cell line A549 was used. After several microscopy assays and colony forming units (CFUs) counting studies, it was found that, under the conditions used, the strains did not show adhesion, internalization nor cytotoxicity towards this cell type.

In the case of neutrophils, an active phagocytosis with death of the bacteria inside the phagocytes was observed by confocal microscopy and videomicroscopy. On the other hand, after four hours of infection, in some cases, the release of NETs by neutrophils stimulated with *Acinetobacter* spp. strains was observed. This phenomenon was verified by means of immunofluorescence, and both DNA and NETs proteins quantification, such as neutrophil elastase and citrullinated histone H3. In addition, analyzing the gene expression of

neutrophils infected with *A. baumannii* for two hours, an activation of the cells was verified, since a statistically significant overexpression of several proinflammatory genes that codify proteins such as NF κ B, IL-1 β o IL-8 was observed. These experiments show that neutrophils are key cells in the control of *Acinetobacter* infection.

All the results obtained in this work regarding *Acinetobacter* and host cells interactions have allowed to increase the knowledge about pathogenicity mechanisms of these bacteria and organism response to their infection.

INTRODUCCIÓN
1. Acinetobacter

1.1. Origen y taxonomía

El género Acinetobacter comprende un conjunto de especies bacterianas pertenecientes al filo de las Proteobacterias, familia Moraxellaceae, orden Gammaproteobacteria. Un microorganismo perteneciente a este grupo fue aislado por primera vez en 1911 por el microbiólogo alemán Beijerinck a partir de una muestra de suelo que sembró en medio con acetato de calcio, por lo que esta bacteria fue designada inicialmente como Micrococcus calcoaceticus (Beijerinck, 1911). En años sucesivos, se descubrieron una serie de microorganismos similares que fueron clasificados en distintos géneros y especies. No fue hasta 1954, cuando Brisou y Prévot propusieron el nombre de Acinetobacter, que proviene del término griego "Akinetos" y que tiene como significado "no móvil" (Brisou y Prévot, 1954). En el año 1971, Acinetobacter fue reconocido de manera oficial como género (Lessel, 1971). Posteriormente, se distinguieron doce genoespecies (especies genómicas) utilizando métodos de hibridación ADN-ADN. A algunas de ellas se les otorgaron nombres como A. baumannii, A. calcoaceticus, A. haemolyticus, A. johnsonii, A. junii y A. lwoffii (Bouvet y Grimont, 1986).

En la actualidad, el género está compuesto por más de cincuenta especies validadas (Tabla 1) (http://www.bacterio.net/acinetobacter.html; acceso: 2018).

| Especie | Genoespecie | Referencia | Origen |
|-----------------|---------------|------------------------|--------------------|
| A. albensis | | Krizova y cols., 2015 | Agua |
| A. apis | | Kim y cols., 2014 | Animal |
| A. baumannii | 2 | Bouvet y Grimont., | Muestras clínicas, |
| | | 1986 | suelo, vegetales |
| A. baylyi | | Carr y cols., 2003 | Lodo, suelo |
| A. beijerinckii | | Nemec y cols., 2009 | Agua, suelo |
| 1 horoziniao | | Nemec y cols., 2010 | Suelo, muestras |
| 11.00104,0000 | A. Dereginine | | humanas, vegetales |
| A. bohemicus | | Krizova y cols., 2014 | Ambiental |
| A. boissieri | | Álvarez-Pérez y cols., | Néctar de flores |
| | | 2013 | |
| A. bouvetii | | Carr y cols., 2003 | Lodo |
| A. brisouii | | Anandham y cols., 2010 | Suelo |

| A. calcoaceticus | 1 | Beijerinck, 1911 | Suelo, agua, muestras clínicas humanas |
|-------------------|------|------------------------------------|--|
| A. celticus | | Radolfova-Krizova y cols., 2016 | Suelo |
| A. courvalinii | | Nemec y cols., 2016 | Animal |
| A. dispersus | | Nemec y cols., 2016 | Agua |
| A. dijkshoorniae | | Cosgaya y cols., 2016 | Muestras clínicas humanas |
| A. equi | | Poppel y cols., 2016 | Animal |
| A. gandensis | | Smet y cols., 2014 | Animal |
| A. gerneri | | Carr y cols., 2003 | Lodo |
| A. grimontii | | Carr y cols., 2003 | Lodo |
| A. guangdongensis | | Feng y cols., 2014 | Ambiental |
| A. guillouiae | 11 | Nemec y cols., 2010 | Suelo, agua, heces |
| A. gyllenbergii | | Nemec y cols., 2009 | Muestras humanas |
| A. haemolyticus | 4 | Bouvet y Grimont, 1986 | Muestras humanas |
| A. harbinensis | | Li y cols., 2014 | Agua fresca |
| A. indicus | | Malhotra y cols., 2012 | Vertedero |
| A. johnsonii | 7 | Bouvet y Grimont, 1986 | Suelo, agua, piel humana, animal |
| A. junii | 5 | Bouvet y Grimont, 1986 | Muestras humanas |
| A. kookii | | Choi y cols., 2013 | Suelo |
| A. lactucae | | Rooney y cols., 2016 | Plantas |
| A. lwoffii | 8-9 | Brisou y Prévot., 1954 | Piel humana, animal |
| A. modestus | | Nemec y cols., 2016 | Muestras clínicas humanas |
| A. nectaris | | Álvarez-Pérez y cols., 2013 | Néctar de flores |
| A. nosocomialis | 13TU | Nemec y cols., 2011 | Muestras clínicas humanas, suelo |
| A. pakistanensis | | Abbas y cols., 2014 | Industrial |
| A. parvus | | Nemec y cols., 2003 | Muestras humanas, animales |
| A. pittii | 3 | Nemec y cols., 2011 | Muestras humanas vegetales, suelo |
| A. populi | | Li y cols., 2015 | Plantas |

| A. pragensis | | Radolfova-Krizova y cols., 2016 | Suelo |
|-------------------|----|------------------------------------|-------------------------------|
| A. proteolyticus | | Nemec y cols., 2016 | Muestras humanas |
| A. puyangensis | | Li y cols., 2013 | Muestras de plantas |
| A. qingfengensis | | Li y cols., 2014 | Plantas |
| A. radioresistens | 12 | Nishimura y cols., 1988 | Algodón, suelo |
| A. rudis | | Vaz-Moreira y cols., 2011 | Muestras de residuos |
| A. schindleri | | Nemec y cols., 2001 | Muestras clínicas |
| A. seifertii | | Nemec y cols., 2015 | Muestras clínicas |
| A. soli | | Kim y cols., 2008 | Suelo |
| A. tandoii | | Carr y cols., 2003 | Lodo activado |
| A. tjernbergiae | | Carr y cols., 2003 | Lodo activado |
| A. towneri | | Carr y cols., 2003 | Lodo activado |
| A. ursingii | | Nemec y cols., 2001 | Muestras clínicas |
| A. variabilis | | Krizova y cols., 2015 | Muestras humanas, animales |
| A. venetianus | | Di cello y cols., 1997 | Agua marina |
| A. vivianii | | Nemec y cols., 2016 | Muestras clínicas |

Tabla 1. Especies de Acinetobacter validadas.

Por su similitud genómica, a las especies *A. calcoaceticus, A. baumannii, A. nosocomialis* (anteriormente conocida como genoespecie 13 TU) y *A. pittii* (anteriormente conocida como genoespecie 3) se les ha englobado dentro de lo que se conoce como *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex (complejo ACB) (Nemec y cols., 2011). Este grupo es el más importante del género desde el punto de vista clínico y es el causante de la mayor parte de infecciones provocadas por especies de *Acinetobacter* (Lee y cols., 2011).

1.2. Características morfológicas y hábitats

Las especies de *Acinetobacter* están integradas por cocobacilos pequeños, de un tamaño aproximado de 1-2,5 µm (Figura 1). Se trata de bacterias Gram-negativas, estrictamente aerobias, no móviles (sin embargo, en *A. baumannii*, se ha descrito la capacidad de llevar a cabo movimientos del tipo "twiching" y "gliding" en medios semisólidos (Towner, 2009)), catalasa positivas, indol negativas, oxidasa negativas, citrato positivas y con un contenido en guanina y citosina (G+C) de entre el 39% y el 47% (Peleg y cols., 2008). En ocasiones se encuentran encapsuladas, no tienen flagelos, aunque pueden presentar pili o fimbrias en su superficie (Tomaras y cols., 2003) (Figura 1). Se sabe, además, que crecen en un amplio rango de temperaturas, siendo el óptimo de 33°C a 35°C, y no forman esporas (Jawad y cols., 1994).

Las bacterias de este género se encuentran ampliamente distribuidas en un gran número de ambientes aunque, han sido comúnmente asociadas con ciertos hábitats, tales como agua, aceites, suelo, animales o incluso alimentos humanos (Tabla 1) (Peleg y cols., 2008).



Figura 1. **Morfología de** *Acinetobacter*. Fotografía de microscopía electrónica de transmisión tomada a $\times 10000$ aumentos de *A. baumannii* ATCC[®] 19606TM, mostrando una morfología típica de cocobacilo y la presencia de fimbrias.

1.3. Métodos de identificación de especies

Como se ha comentado anteriormente, debido a su gran similitud, es complicado distinguir entre las especies que componen el complejo ACB anteriormente mencionado (Turton y cols., 2010; Lee y cols., 2011). Los métodos utilizados a este respecto se describen a continuación y se han dividido en fenotípicos y genotípicos.

1.3.1. Métodos fenotípicos

A la hora de distinguir bacterias de este género se utiliza a menudo el medio Leeds *Acinetobacter*, empleado principalmente en los estudios de colonización de los programas de vigilancia epidemiológica nosocomial (Jawad y cols., 1994; McConnell y cols., 2011).

En el año 1986, se propuso un esquema de identificación fenotípica basado en veintiocho ensayos al que se añadieron sucesivamente nuevos test (Bouvet y Grimont, 1986). En la actualidad este método ha sido prácticamente abandonado por resultar excesivamente laborioso.

La identificación de las especies del complejo ACB con métodos tradicionales (API 20 NE, Vitek 2, Phoenix o MicroScan Walkaway) es complicada, ya que la mayoría de dichas técnicas no consigue determinar con exactitud la especie concreta (Wisplinghoff, 2017).

1.3.2. Métodos genotípicos

Este tipo de métodos, aunque más caros, son mucho más precisos y fiables que los anteriores, ya que la mayoría permiten discernir entre las genoespecies de las bacterias pertenecientes a este género. Las técnicas más utilizadas son: el análisis de restricción de ADN ribosómico amplificado (ARDRA) (Dijkshoorn y cols., 1998), el estudio de polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Janssen y cols., 1997) y la hibridación ADN-ADN (Tjernberg y Ursing, 1989).

Existen otros métodos genotípicos que consiguen aún mejores resultados a la hora de distinguir especies patógenas similares dentro del género *Acinetobacter*. Entre ellos destacan: la detección del gen de una oxacilinasa (OXA), la OXA-51 (*bla*_{OXA-51}) específica en *A. baumannii* (Turton y cols., 2006), la técnica de PCR acoplada a ionización por electrospray, la espectrometría de masas (PCR/ESI-MS) (Ecker y cols., 2006), la

espectrometría de masas por desorción/ionización con láser asistida por matriz (MALDI-TOF) (Li y cols., 2018) y la PCR de genes específicos como *gyrB* (Teixeira y cols., 2017; Higgins y cols., 2010) o *rpoB* (La Scola y cols., 2006; Gundi y cols., 2009).

Es importante el empleo de métodos fiables ya que, debido a la gran similitud entre las cepas de especies pertenecientes al complejo ACB, en muchas ocasiones se han identificado erróneamente como *A. baumannii* bacterias pertenecientes a otras especies como *A. pittii* o *A. nosocomialis*, infravalorando así el potencial patogénico de estas dos especies.

1.4. Infecciones causadas por Acinetobacter

Aunque *Acinetobacter* se considera una bacteria de origen ambiental, en los últimos años especies pertenecientes a este género han adquirido una gran importancia como patógenos nosocomiales. Se les considera responsables de infecciones hospitalarias, especialmente importantes en el caso de pacientes ingresados en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs) donde se asocian a una alta tasa de mortalidad (hasta un 30%) (Almasaudi, 2018; Jung y Park, 2015).

Las afecciones que causa este patógeno son diversas y se suelen asociar a órganos con altos niveles de fluidos, tales como tractos respiratorio o urinario y cavidad peritoneal, o a la utilización de diversos dispositivos médicos, como es el caso de los catéteres (Almasaudi, 2018). A continuación, se describen algunas de las patologías más frecuentes causadas por esta bacteria.

- Neumonía

La neumonía nosocomial es la patología más frecuentemente asociada a *Acinetobacter*. Su incidencia varía geográficamente y en ocasiones resulta difícil diferenciar entre la colonización y la infección en los pacientes. Por ejemplo, en las UCIs se han detectado casos en una frecuencia de infección que oscila entre el 3 y el 5%, con una tasa de mortalidad del 30 al 75%. Curiosamente, *A. baumannii* es el segundo patógeno Gram-negativo más aislado en las neumonías intrahospitalarias (Luna y Aruj, 2007).

También se han detectado casos aislados de neumonía adquirida en la comunidad en niños y personas inmunodeprimidas, en Australia y Asia durante la estación de lluvias y en adultos con problemas de alcoholismo o Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (Falagas y cols., 2007; Ong y cols., 2009; Eugenin, 2013).

- Bacteriemia (infección del torrente sanguíneo)

En una gran parte de los casos en que se detectan las infecciones del torrente sanguíneo, se desconoce el origen de las bacterias implicadas. En los casos en que se ha podido averiguar, se ha comprobado que procedían de catéteres intravasculares o entubaciones del tracto

respiratorio. En menor medida, las bacteriemias se pueden producir por bacterias procedentes de infecciones en huesos, de quemaduras o del tracto urinario, siendo más infrecuentes las derivadas de endocarditis. La tasa de mortalidad de estos tipos de infecciones es variable y disminuye en el caso de pacientes que no se encuentran en la UCI (Cisneros y Rodríguez-Baño, 2002).

- Trauma e infecciones de quemaduras

En la población militar, se han constatado numerosos casos de heridas de guerra infectadas por *A. baumannii*, que conducen a patologías graves en piel y tejidos blandos. Por ejemplo, en las guerras de Iraq y Afganistán, *Acinetobacter* fue el microorganismo más prevalente en heridos de guerra americanos con fracturas de tibia (32,5%) (Davis y cols., 2005).

- Infecciones del tracto urinario (ITUs)

Las ITUs causadas por *Acinetobacter* son infrecuentes y generalmente están asociadas a la presencia de catéteres en los pacientes (Jiménez-Guerra y cols., 2018).

- Meningitis

En los últimos tiempos se ha incrementado la prevalencia de meningitis debidas a *Acinetobacter*; una afección asociada con una alta tasa de mortalidad (Kim y cols., 2009).

- Otras manifestaciones

Aunque en menor medida que las anteriormente descritas, se han producido casos de otras infecciones como endocarditis (Laganà y cols., 2015), peritonitis (Chao y cols., 2014) y queratitis asociada a lentes de contacto o tras una cirugía ocular (Marcovich y Levartovsky, 1994).

32

1.5. Transmisión de Acinetobacter

Tal y como se mostró en la Tabla 1, diversas especies de *Acinetobacter* han sido aisladas de muestras tan dispares como pacientes, animales, suelos, lodos y alimentos. Sin embargo, la mayor parte de la investigación epidemiológica realizada sobre este patógeno se ha centrado en el aspecto clínico y en la manera en que *Acinetobacter* es capaz de llegar a los pacientes (Eveillard y cols., 2013; Al Atrouni y cols., 2016).

Acinetobacter puede encontrarse en la piel humana, formando parte de su microbiota (Seifert y cols., 1997; Fyhrquist y cols., 2014), y es capaz de colonizar distintos nichos en el cuerpo humano tales como la cavidad oral, la faringe o el intestino (Ayats y cols., 1997).

Uno de los aspectos más reseñables es la aparición de cepas multirresistentes de *A*. *baumannii* en los hospitales. Si estas cepas son introducidas por un paciente colonizado, pueden transmitirse con facilidad al ambiente, a las superficies, al mobiliario, al personal sanitario o a otros pacientes (Bravo y cols., 2016).

El método de transmisión más común de las cepas de *Acinetobacter* en el ambiente hospitalario es, precisamente, a través de las manos del personal sanitario. Dicha transmisión se ve facilitada por su capacidad de sobrevivir durante largos periodos de tiempo en condiciones desfavorables (falta de nutrientes y baja humedad) y al hecho de que poseen gran resistencia a desinfectantes y biocidas (Bravo y cols., 2016; Bravo y cols., 2018; Chapartegui-González y cols., 2018).

1.6. Resistencia a antibióticos

El principal problema a la hora de tratar las infecciones, citadas en el apartado 1.4., es el hecho de que *Acinetobacter* spp., especialmente *A. baumannii*, posee una gran propensión a desarrollar resistencias a gran parte de los antimicrobianos utilizados en la práctica clínica, incluso a aquellos denominados como de último recurso (Qureshi y cols., 2015). Tal es así que la OMS ha publicado recientemente una lista con los patógenos humanos contra los que hay una necesidad crítica de encontrar nuevos antimicrobianos (Tacconelli y cols., 2018), que sitúa a *A. baumannii* resistente a los antibióticos carbapenémicos en el primer puesto (http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/; acceso: 2018).

Antes de empezar a explicar los mecanismos de resistencia es necesario aclarar los siguientes conceptos (Magiorakos y cols., 2012):

- Se dice que una cepa es multirresistente (MDR) cuando presenta resistencia a una familia de antibióticos de tres testadas (Nowak y cols., 2017).

- El término extremadamente resistente (XDR) se aplica en el caso de que una cepa sea resistente a todas las clases de antibióticos excepto a una de ellas (Nowak y cols., 2017).

- El término panresistente (PDR) hace referencia a aquellas cepas que son resistentes a todas las clases de antimicrobianos conocidos (Nowak y cols., 2017).

1.6.1. Genética de la resistencia en Acinetobacter spp.

La facilidad que *Acinetobacter* spp. posee para acumular mecanismos de resistencia viene determinada por el hecho de que son bacterias con una gran plasticidad genética y transformables de forma natural (Imperi y cols., 2011).

Acinetobacter utiliza los tres mecanismos conocidos de transferencia de información genética entre bacterias: transformación, conjugación y transducción (Da Silva y Domingues, 2016). A nivel intracelular poseen un número elevado de transposones, que les permiten intercambiar elementos genéticos entre los plásmidos y el cromosoma, así como integrones, capaces de incorporar operones completos de genes (Huang y cols., 2015; Nigro y Hall., 2016; Pagano y cols., 2016). Además, se han comenzado a estudiar las vesículas de

membrana externa (OMVs) como posibles vehículos de intercambio de genes de resistencia a antibióticos (Rumbo y cols., 2011).

1.6.2. Mecanismos de resistencia

A continuación se explican los mecanismos de resistencia que presenta *Acinetobacter* hacia los antibióticos β -lactámicos, aminoglicósidos, quinolonas, tetraciclinas, glicilciclinas y polimixinas.

1.6.2.1. Resistencia a β-lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos, especialmente los carbapenémicos, son la primera elección a la hora de tratar las infecciones causadas por estas bacterias. La resistencia a esta importante familia de antibióticos puede venir determinada por mecanismos que impliquen la presencia de enzimas (enzimáticos) o que no las requieran para ello (no enzimáticos). Ambos pueden actuar de manera sinérgica. A continuación, se detallan los descritos hasta la fecha.

Mecanismos enzimáticos

Una de las principales estrategias de resistencia de estas bacterias hacia los antimicrobianos β -lactámicos es la presencia de β -lactamasas. Estas enzimas, capaces de hidrolizar dichos antimicrobianos, se dividen en cuatro grupos o clases moleculares, de acuerdo a la clasificación de Ambler (Ambler, 1980):

- Clase A: en *Acinetobacter* se han descrito β-lactamasas de espectro extendido (BLEEs), capaces de hidrolizar cefalosporinas de tercera generación, como TEM-92 (Endimiani y cols., 2007), TEM-116 (Naiemi y cols., 2005), SHV-12 (Naiemi y cols., 2005), CTX-M-2 (Celenza y cols., 2006), CTX-M-43 (Celenza y cols., 2006), VEB-1 (Naas y cols., 2006), PER-1 (Carbonne y cols., 2005) y PER-2 (Celenza y cols., 2006).
- Clase B (metaloenzimas): estas enzimas son capaces de hidrolizar todos los β-lactámicos, excepto el aztreonam, y se sitúan habitualmente en integrones (Almasaudi, 2018). En *Acinetobacter* se han detectado la β-lactamasa hidrolizante de imipenem (IMP) (Chu y cols., 2001; Cornaglia, 1999; Da Silva y cols., 2002; Lee y

cols., 2003) y la metalo-β-lactamasa codificada por integrón Verona (VIM) (Lee y cols., 2003; Tsakris y cols., 2006).

- Clase C: dentro de este grupo se encuentran las cefalosporinasas tipo AmpC, enzimas intrínsecas en *A. baumannii*, que también se denominan cefalosporinasas derivadas de *Acinetobacter* (ADCs) (Bou y cols., 2000; Corvec y cols., 2003). Cuando estas enzimas se expresan a nivel basal, no confieren resistencia. Sin embargo, cuando están asociadas a la presencia corriente arriba de la secuencia de inserción conocida como IS*Aba1*, se puede producir la sobreexpresión de las mismas, lo que confiere resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro (Corvec y cols., 2003). No obstante, se sabe que este mecanismo de resistencia no afecta a cefepime ni a los antibióticos carbapenémicos (Peleg y cols., 2008).
- Clase D (oxacilinasas): se trata de un grupo de enzimas muy importante y su asociación con ciertos elementos de inserción puede provocar su sobreexpresión. Una cepa con enzimas de este tipo se describió por primera vez en 1985, tratándose de la OXA-23 (Paton y cols., 1993). El grupo de genes que codifican esta enzima se encuentra en un plásmido que se denomina *bla*_{OXA-23}. Posteriormente, se describió la presencia de OXA-24 codificada por el grupo de genes *bla*_{OXA-24} que codifica además otras tres oxacilinasas (Peleg y cols., 2008). El tercer grupo de OXAs descubierto es el grupo de enzimas codificadas por *bla*_{OXA-51}, en el que se engloban trece enzimas y que necesita de la secuencia de inserción IS*Aba1* en su promotor para expresarse. Y, por último, el grupo OXA-58 que, al igual que el grupo de OXA-23, se encuentra en un plásmido (Peleg y cols., 2008).

Mecanismos no enzimáticos

Aunque los mecanismos enzimáticos sean los que más importancia cobran en la resistencia de *Acinetobacter* a los β -lactámicos, los no enzimáticos también resultan importantes para acentuar esta resistencia, actuando muchas veces de forma sinérgica con las β -lactamasas. Los principales mecanismos no enzimáticos son los siguientes:

• Cambios en proteínas de membrana externa (OMPs). Se ha publicado que la reducción de la expresión de este tipo de proteínas o su mutación están relacionadas

con el aumento de la resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter* spp. (Mostachio y cols., 2012). Se hipotetiza con que este mecanismo puede trabajar sinérgicamente con enzimas de tipo OXA.

- Bombas de eflujo. Los mecanismos más estudiados dentro de este grupo están compuestos por tres componentes: una bomba presente en la membrana citoplasmática, un canal de salida (canales de porinas que atraviesan la membrana externa) y una lipoproteína de conexión entre la bomba y el canal. Una de ellas, una bomba de tipo resistencia de división de nodulación (RND) denominada AdeABC, es la que se ha estudiado de manera más extensa y su sustrato incluye β-lactámicos y otros antimicrobianos (Wieczorek y cols., 2008). Este sistema compuesto por tres proteínas (AdeA, AdeB, AdeC) se encuentra regulado, a su vez, por el sistema de dos componentes sensor/regulador formado por AdeS y AdeR, que puede modular la sobreexpresión de la bomba. Recientemente, ha sido descubierta la bomba AbeM que confiere resistencia a fluoroquinolonas (Wieczorek y cols., 2008).
- Modificación de proteínas de unión a penicilina (PBPs) para evitar su interacción con el antibiótico β-lactámico (Vashist y cols., 2011).

1.6.2.2. Resistencia a aminoglicósidos

Los aminoglicósidos son un tipo de antibióticos empleados en clínica de manera común. Es muy frecuente el aislamiento de *A. baumannii* multirresistentes que presentan enzimas modificantes de aminoglicósidos (EMAs). Este tipo de enzimas incluyen acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas. Se ha descrito la modificación por metilación del ARNr 16S por medio de una metilasa, mecanismo que confiere alto nivel de resistencia a aminoglicósidos (Lee y cols., 2006; Nemec y cols., 2004). Los genes responsables de estas modificaciones se encuentran normalmente en transposones o plásmidos, lo cual facilita su transmisión. Otros mecanismos de resistencia a estos antimicrobianos incluyen la interrupción de la llegada del antibiótico al interior celular o bombas de eflujo para expulsar el antimicrobiano (Peleg y cols., 2008).

1.6.2.3. Resistencia a quinolonas

La modificación de la ADN girasa o topoisomerasa IV por medio de la mutación en las regiones determinantes de la resistencia a quinolonas de los genes *gyrA* y *parC*, respectivamente, es el método principalmente descrito en *A. baumannii* para adquirir resistencia a estos antimicrobianos (Hamouda y Amyes, 2004). Estos cambios disminuyen la afinidad de las quinolonas por el complejo enzima-ADN. También actúan sobre ellos las bombas de eflujo AdeABC y AbeM, anteriormente descritas (Wieczorek y cols., 2008).

1.6.2.4. Resistencia a tetraciclinas y glicilciclinas

La resistencia a estos tipos de compuestos está mediada por bombas de eflujo o por la protección del ribosoma bacteriano (Guardabassi y cols., 2000). En el primer tipo, existen dos proteínas específicas de estos compuestos, Tet(A) y Tet(B). La primera es responsable de la expulsión de tetraciclina de la célula bacteriana y la segunda expulsa adicionalmente minociclina (Ribera y cols., 2003). Estos antibióticos son también susceptibles a la acción del sistema de eflujo AdeABC (Wieczorek y cols., 2008). Por otro lado, el sistema de protección ribosomal previene al ribosoma de la acción de tetraciclina, doxiciclina y minociclina.

1.6.2.5. Resistencia a polimixinas

La polimixina B y la polimixina E (o colistina) son antibióticos peptídicos descubiertos en el año 1947 (Koyama y cols., 1950). Representan la última opción terapéutica para tratar infecciones causadas por *Acinetobacter* multirresistentes (Cai y cols., 2012). Sin embargo, ya se han detectado cepas de *A. baumannii* que presentan resistencia a este tipo de antibióticos, aunque el mecanismo aún no se encuentra completamente dilucidado (Cai y cols., 2012).

Por último, cabe señalar que a la hora de tratar con antibióticos las infecciones causadas por *Acinetobacter* y, debido al problema de sus resistencias a los mismos, el tratamiento puede variar en función de la cepa y del antibiótico utilizado. En el caso de no presentar resistencia a carbapenémicos, este tipo de antibióticos son la primera opción. También se utiliza el inhibidor de β -lactamasas sulbactam, tigeciclina, aminoglicósidos como tobramicina y amikacina y, como última opción, colistina (Peleg y cols., 2008).

1.7. Factores de virulencia

Las especies pertenecientes al género *Acinetobacter* se consideran, en general, organismos de baja virulencia. En el caso de *A. baumannii*, la presencia de factores de virulencia ha sido poco estudiada en relación a otros aspectos como la resistencia a antibióticos. Además, los factores de virulencia permanecen prácticamente inexplorados en otras especies relevantes como *A. pittii*.

A continuación se detallan algunos de los factores de virulencia más importantes que se han descrito hasta la fecha:

- Lipopolisacárido (LPS)

Se trata de un gran estimulador de la respuesta inmunitaria y provoca la liberación, por parte de las células defensivas, de diversas moléculas proinflamatorias. Esta sustancia tiene una gran relevancia en las septicemias provocadas por *A. baumannii* (Luke y cols., 2010).

- Polisacáridos capsulares (CPs)

Estas moléculas bloquean el acceso al sistema del complemento, facilitando así la resistencia al suero y la evasión del sistema inmunitario en estas bacterias. Se han determinado los genes *ptk* y *epsA* como importantes a la hora de la formación de la cápsula en *A. baumannii* (Russo y cols., 2010).

- Hidrofobicidad de la superficie celular

Esta característica es importante para la adhesión celular y se ha descrito que, en algunos patógenos, puede ayudar a evitar la fagocitosis por parte de las células del sistema inmunitario (Boujaafar y cols., 1990; Krasowska y Sigler, 2014).

-Proteínas de membrana externa (OMPs)

Se trata del factor de virulencia mejor caracterizado en *A. baumannii*. Se han descrito en diversas cepas OMPs, pertenecientes a la familia OmpA, importantes para patogénesis, adaptación a células hospedadoras y resistencia a antibióticos. Han sido relacionadas con la adhesión y la inducción de la apoptosis en células epiteliales (Choi y cols., 2005; Choi y cols., 2008).

- Quorum-sensing (QS)

Este proceso de comunicación celular está relacionado con la producción de otros factores de virulencia, como la transferencia de plásmidos, la bioluminiscencia, la resistencia a antibióticos o la formación de biocapas en distintas especies de bacterias. En *Acinetobacter* se asocia a movimiento, formación de biofilm e incluso a aumento de la resistencia a ciertos antibióticos (Dou y cols., 2017; Irie y Parsek., 2008).

- Sideróforos

La fijación de hierro del hospedador es una de las estrategias que utiliza *Acinetobacter* durante el proceso de infección. En *A. baumannii*, este sistema está formado por un clúster de genes, *dhb*, que codifican para las proteínas OM73, p45 y p114, las cuales participan activamente en el sistema de biosíntesis y transporte de la acinetobactina, el sideróforo más importante encargado de captar el hierro de la hemoglobina humana (Gaddy y cols., 2012).

- Enzimas hidrolíticas

Este tipo de enzimas, principalmente las fosfolipasas, son capaces de degradar la membrana celular eucariota, lo que puede facilitar la invasión del hospedador (Jacobs y cols., 2010).

- Vesículas de membrana externa (OMVs)

Se trata de estructuras circulares que contienen material muy diverso, desde ADN a proteínas, así como factores de virulencia. Se cree que participan en el intercambio de información entre las bacterias, en la resistencia a antibióticos y en la interacción del microorganismo con las células del hospedador (Kwon y cols., 2009; Li y cols., 2015).

- Sistemas de secreción

Se ha descrito en *A. baumannii* la presencia de los sistemas de secreción de tipo II (Johnson y cols., 2015), tipo IV (Bentancor y cols., 2012) y tipo VI (Carruthers y cols., 2013), cada uno de ellos con distintas implicaciones patogénicas y relacionados con la supervivencia de la bacteria.

-Proteínas de unión a penicilina (PBPs)

Estas enzimas son responsables de la síntesis de peptidoglicano y su presencia hace que el acceso por parte de las células inmunitarias del hospedador sea más complicado (Vashist y cols., 2011).

- Formación de biocapas

Una biocapa (biofilm o biopelícula) puede ser definida como una comunidad estructurada de células bacterianas que se encuentran envueltas en una matriz polimérica que ellas mismas han producido, compuesta por diversos componentes como exopolisacáridos, ácidos teicoicos y ADN extracelular, que favorece la adhesión entre las propias bacterias y la adhesión de estas a una superficie sólida (inerte o viva) (Costerton y cols., 1999). Se ha demostrado la capacidad de un gran número de cepas clínicas de *A. baumannii* y *A. pittii* de formar biocapas, proceso que les puede ayudar en su persistencia en el ambiente hospitalario y en el incremento de la resistencia antibiótica (Gaddy y Actis, 2009; Chapartegui-González y cols., 2018).

El biofilm de estas cepas se forma *in vitro* en la interfase aire-líquido. En la cepa de referencia *A. baumannii* ATCC[®] 19606TM se ha descrito que la presencia de pili es esencial para la formación de biocapas. Esta estructura está condicionada por el operón *csuA/BABCDE*. Además, la proteína Bap, homóloga a la proteína asociada al biofilm de *Staphylococcus aureus*, también resulta crítica en este proceso de formación de biofilm en estas especies (Gaddy y Actis, 2009).

2. Interacción de Acinetobacter con células epiteliales

Durante una infección, la interacción de los microorganismos con las células epiteliales es un proceso clave, ya que estas células representan la primera línea de defensa pasiva del organismo ante los patógenos. Por lo tanto, la adherencia de las bacterias a este tipo de células es considerado un primer paso esencial en la patogénesis bacteriana (Gómez y Prince, 2008). En muchas ocasiones, además de actuar como barrera física, estas células son capaces de producir citocinas y otras moléculas responsables de atraer al sitio de infección a células fagocíticas profesionales como neutrófilos o macrófagos (Philpott y cols., 2001).

Los modelos *in vitro* de células epiteliales representan una herramienta muy útil e indispensable para poder llevar a cabo estudios sobre las interacciones entre el hospedador y el patógeno. La adherencia y posterior invasión de estos tipos celulares pueden ser cruciales para la supervivencia del patógeno, ya que les ayuda a evitar el medio externo hostil para poder así dividirse y propagarse (Gómez y Prince, 2008).

Se han realizado experimentos para dilucidar los mecanismos por los cuales *A. baumannii* podría adherirse o invadir las células del hospedador. Los estudios que han evaluado la adherencia de *Acinetobacter* spp. a células epiteliales se han centrado en el epitelio pulmonar, por ser la neumonía la afección más común causada por este patógeno. Concretamente, la línea celular A549 (una línea humana de adenocarcinoma alveolar basal) ha sido ampliamente utilizada. En su mayoría, estos trabajos se han basado en el recuento de bacterias en placa y han tenido como resultado un alto nivel de variabilidad entre los distintos aislados, respecto a su capacidad de unión a dichas células (Gaddy y cols., 2009; Gaddy y cols., 2012; Smani y cols., 2012). La incompleta caracterización de los factores de virulencia de *A. baumannii* dificulta su comparación con otras especies bacterianas. Además, casi todos los estudios se han centrado en la especie *A. baumannii* condenando al ostracismo a otras especies de relevancia clínica como *A. pittii* o *A. nosocomialis*.

3. Respuesta inmunitaria frente a Acinetobacter

Teniendo en cuenta el problema de la resistencia a los antibióticos y que el proceso de resolución de la infección depende también en gran medida de la respuesta inmunitaria del hospedador, resulta necesario aumentar el conocimiento sobre la interacción entre *Acinetobacter* y el sistema inmunitario. Esto podría permitir el desarrollo de futuras inmunoterapias como complemento o sustitución de los antibióticos.

A pesar de que sean necesarios más estudios, hay evidencias de que en la respuesta a la infección por *Acinetobacter* participan diversas células del sistema inmunitario, como monocitos, macrófagos y células dendríticas (CDs). En algunos de los estudios realizados en ratones, se ha observado un rápido reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección, por lo que se ha considerado a estas células como clave de la respuesta inmunitaria innata en las infecciones causadas por *Acinetobacter* spp. (García-Patiño y cols., 2017; Breslow y cols., 2011; Van Faassen y cols., 2007). También se ha observado en ratones con neutropenia infectados con *A. baumannii* una mortalidad mucho más elevada (Grguric-Smith y cols., 2015). Sin embargo, la mayor parte de estos estudios están realizados en ratones y, dada la gran diferencia entre los neutrófilos humanos y los murinos, se necesitan más estudios sobre el papel que juegan estas células en las infecciones humanas (Mestas y Hughes, 2004).

Distintos autores coinciden en que *A. baumannii* provoca en el hospedador una respuesta proinflamatoria. Se ha comprobado que la proteína OmpA es un antígeno principal a la hora de la inducción de la respuesta inmunitaria humoral (García-Patiño y cols., 2017), ya que se ha demostrado que la opsonización bacteriana por medio de un anticuerpo anti-OmpA se relaciona con un incremento de la fagocitosis mediada por macrófagos. Sin embargo, a día de hoy, la contribución de la respuesta inmunitaria adaptativa a este patógeno requiere de más estudios para poder ser completada.

Dados los resultados obtenidos en esos trabajos realizados en el modelo murino y la necesidad de aumentar el conocimiento sobre la respuesta de los neutrófilos humanos a la infección de *Acinetobacter* spp., la presente tesis doctoral tendrá como uno de sus principales objetivos este último aspecto.

4. Neutrófilos

4.1. Características de los neutrófilos

Los neutrófilos, también conocidos como polimorfonucleares (PMNs), son leucocitos de tipo granulocítico. Fueron descubiertos en 1880 por Paul Erlich (Erlich, 1880), y unos años después, sería Iliá Metchnikoff quién interpretaría que su principal función es la fagocitosis, tras comprobar cómo se producía un reclutamiento de células fagocíticas al sitio de infección en una larva de estrella de mar (Metchnikoff, 1893).

A nivel morfológico, son dos las características principales que los definen cuando se encuentran en un estado maduro: por un lado, la presencia de gránulos en su citoplasma y, por otro lado, la posesión de un núcleo lobulado (de tres a seis lóbulos) (Figura 2). Estas células pertenecen a la respuesta inmunitaria innata y representan la primera línea de defensa activa del organismo ante una agresión externa (Amulic y cols., 2012).



Figura 2. Características morfológicas de los neutrófilos. Fotografía de microscopía de fluorescencia y de contraste de fases de neutrófilos humanos recién aislados de sangre periférica. A la izquierda se observa el ADN del núcleo marcado con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (azul) y a la derecha se observa la morfología celular de los neutrófilos por contraste de fases. Barra de escala: 10 µm.

Los PMNs se sintetizan en la médula ósea a partir de células pluripotentes que se diferencian a mieloblastos, los cuales maduran a neutrófilos, que finalizan el proceso tras formar las proteínas que se almacenan en los gránulos de su citoplasma (Tak y cols., 2013).

La producción de este tipo de células también se puede dar en otros órganos como el hígado y el pulmón. El ritmo de producción de neutrófilos por la médula ósea puede ser de 2×10^{11}

neutrófilos al día. Se trata de los glóbulos blancos circulantes más numerosos en un humano (pueden representar el 70% del total, frente al 10-20% en ratones) (Amulic y cols., 2012). Su vida media es de 1,5 a 8 h (aunque los neutrófilos humanos pueden llegar a vivir hasta 5,4 días) y durante el proceso de inflamación su vida media puede aumentar. En la médula ósea, son una serie de señales de quimiocinas las que controlan la liberación de los neutrófilos a la circulación sanguínea, manteniéndose un reservorio de células listo para liberarse en caso de infección (Amulic y cols., 2012).

4.2. Activación de los neutrófilos

Como ya se ha comentado, los neutrófilos representan la primera línea de defensa activa del organismo ante una agresión externa como puede ser, por ejemplo, un patógeno. Para poder actuar, los neutrófilos necesitan activarse. El proceso de activación es aquel que se produce cuando el neutrófilo sufre una serie de transformaciones que le van a permitir eliminar el daño externo.

Las señales que provocan la activación son diversas, desde LPS y péptidos quimiotácticos bacterianos (fonnil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP)) hasta citocinas (como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-1 β e interleucina 17 (IL-17), entre otras) y quimiocinas, que hacen que las células endoteliales comiencen a producir y exhibir en su superficie moléculas de adhesión como adhesinas e integrinas. En ese momento, los neutrófilos, que se sitúan atravesando de manera continua los vasos sanguíneos, van a encontrarse con estas células endoteliales. Estos neutrófilos expresan, de forma constitutiva, moléculas que reconocen las señales endoteliales inflamatorias: L-selectina o la glicoproteína ligando 1 de P-selectina (PSGL-1). Se produce entonces un primer anclaje de los neutrófilos a las células endoteliales (Figura 3. a.) (Amulic y cols., 2012; Mantovani y cols., 2011).

El siguiente paso se conoce como "rolling" o rodamiento de los neutrófilos a lo largo del endotelio (Figura 3. b.). En ese momento, la maquinaria intracelular del neutrófilo comienza a activarse para poder afrontar la tarea de eliminar a los posibles patógenos. El anclaje de la PSGL-1 y L-selectina va a provocar que se activen una variedad de quinasas en el citoplasma del neutrófilo, como la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K). Esto va a permitir la activación de las integrinas de la familia β -2 (antígeno de función linfocitaria $\alpha L\beta 2$ 1 (LFA-1) y el antígeno de macrófagos 1 (Mac-1)) que se unen a sus ligandos endoteliales, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas como la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) dando como resultado una adhesión firme entre los neutrófilos y el endotelio (Figura 3.c.) (Amulic y cols., 2012; Ley, 2002).

La adhesión fuerte entre los neutrófilos y las células endoteliales es el paso previo a la migración transendotelial o, lo que es lo mismo, el paso de los neutrófilos a través del endotelio, produciendo un lamelipodio por medio de la reorganización de su citoesqueleto (Figura 3. d.) (Choi y cols., 2009).

Una vez se localiza en el medio inflamatorio, el neutrófilo se encuentra con una gran cantidad de moléculas inflamatorias quimioatrayentes que proceden tanto del patógeno como de las células próximas. Durante este proceso, estas moléculas se van a unir a sus correspondientes receptores en los neutrófilos, lo que inicia en estas células la cascada celular conocida como proteína quinasa activada por mitógenos-quinasas reguladas por señales extracelulares (MAPK/ERK), que tiene como consecuencia la activación de la maquinaria oxidativa, proceso clave en la activación. Además, la presencia de microorganismos propicia que se activen miembros de la familia de los receptores de tipo Toll (TLRs) presentes en la superficie de los neutrófilos. Todos estos procesos contribuyen a que, a medida que el neutrófilo se vaya acercando a su diana, tenga preparada su respuesta oxidativa y su degranulación. Como resultado, el neutrófilo llevará a cabo la eliminación del patógeno por medio de las siguientes estrategias: fagocitosis, degranulación, o formación de NETs (Figura 3. e.). Un resumen gráfico se ilustra en la Figura 3 (Amulic y cols., 2012).



Figura 3. Activación de los neutrófilos. Proceso de reclutamiento y activación de neutrófilos en respuesta a un daño. **a**, Adhesión temprana entre neutrófilos y células endoteliales. **b**, "Rolling" de neutrófilos a través del endotelio. **c**, Adhesión irreversible entre neutrófilos y células endoteliales. **d**, Migración transendotelial de los neutrófilos. **e**, Eliminación de los microorganismos por parte de los neutrófilos. Adaptado de Amulic y cols., 2012.

4.3. Eliminación de patógenos: degranulación, fagocitosis y NETosis

4.3.1. Degranulación

Los gránulos de los neutrófilos son estructuras compuestas por un arsenal de proteínas antimicrobianas (Tabla 2). Estas proteínas actúan de dos formas: se fusionan con la membrana plasmática y son liberadas al exterior durante el proceso de degranulación para eliminar a patógenos extracelulares o actúan en el interior celular a nivel del fagosoma, cuando el neutrófilo ha fagocitado a un patógeno (Amulic y cols., 2012; Lacy, 2006).

Tal y como se observa en la Tabla 2, existen cuatro tipos de gránulos que difieren entre sí según su composición proteica, su tamaño y el estado de maduración del neutrófilo en el momento de la liberación (Amulic y cols., 2012; Vols y cols., 2017).

| Gránulos azurofílicos o primarios | Gránulos específicos o secundarios | Gránulos gelatinasa o terciarios | Vesículas secretoras (migración) |
|---|--|--|---|
| Mieloperoxidasa (MPO) | No MPO | No MPO | No MPO |
| Defensinas | Lactoferrina | Gelatinasa | Proteínas derivadas del suero: albúmina |
| Lisozima | Lisozima | Leucolisina | |
| Serín proteasas: EN, proteinasa 3 (PR 3), catepsina G (CG) | Gelatinasa de neutrófilos asociada a lipocalina (NGAL) | | |
| Proteína bactericida que incrementa de la permeabilidad (BPI) | Catelicidina humana (hCAP18) | | |

Tabla 2. Tipos y composición de los gránulos de los neutrófilos. Adaptado de Vols y cols., 2017.

El proceso de movilización de los gránulos hasta la membrana del fagosoma o hasta la membrana plasmática todavía no se encuentra totalmente descrito. Sin embargo, se cree que cambios en la concentración de calcio citoplasmático (Ca^{+2}) podrían jugar un papel importante (Lacy, 2006).

Además de la liberación de las proteínas antimicrobianas, la fusión de los gránulos específicos con la membrana fagosomal o plasmática es imprescindible para el ensamblaje de elementos de la maquinaria oxidativa de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), que permite la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS) creando así un medio inflamatorio que ayuda a la eliminación de los patógenos (Amulic y cols., 2012).

Por otra parte, la liberación al medio externo de ciertas proteínas incluidas en los gránulos, como PR 3, inducen el reclutamiento de otras células del sistema inmunitario, los monocitos. Por lo tanto, además de la evidente función antimicrobiana, la degranulación actúa como elemento quimiotáctico para otras células del sistema inmunitario (Amulic y cols., 2012).

4.3.2. Fagocitosis

La fagocitosis es el proceso principal por el cual se eliminan los patógenos. Se trata de un proceso activo, mediado por receptores, en el que el patógeno se introduce en la célula mediante una vacuola denominada fagosoma (Lee y cols., 2003).

El mecanismo por el que se inicia la fagocitosis depende del tipo de receptores que reconozcan un ligando determinado (Amulic y cols., 2012; Rigby y DeLeo, 2012). Dichos mecanismos pueden ser:

- Directo: reconocimiento directo de un patrón asociado a patógeno (PAMP) por parte de un receptor de la membrana del neutrófilo, por ejemplo, un TLR.

- Mediado por opsoninas: este proceso está mejor caracterizado. Se conocen, a su vez dos ejemplos típicos:

- Fagocitosis mediada por el receptor de la región constante γ (FcγR): requiere la formación de pseudópodos para englobar partículas opsonizadas con inmunoglobulina G (IgG).
- Fagocitosis mediada por receptor del complemento: no requiere la formación de pseudópodos.

Los patógenos son introducidos en el neutrófilo formando un fagosoma. Este fagosoma sufre una maduración, pasando de ser inerte a convertirse en un medio "hostil" con propiedades letales, donde los patógenos resultan eliminados. En el caso de los neutrófilos, hay dos procesos clave que hacen efectiva esta maduración (Quinn y cols., 2006):

- Ensamblaje de la NAPDH oxidasa en la membrana fagosomal. Este complejo enzimático está compuesto por diferentes subunidades; dos de ellas (gp91^{phox} y $p22^{phox}$) se encuentran ancladas en la membrana de manera permanente formando un heterodímero. Cuando se activa el neutrófilo, el resto de componentes que

permanecía en el citoplasma, se ensambla al heterodímero para dar lugar al complejo NADPH oxidasa activo. Esto provoca el comienzo de una cascada para producir diferentes ROS. En primer lugar, el oxígeno molecular se convierte en superóxido, que forma a su vez peróxido de hidrógeno. El superóxido también puede reaccionar con óxido nítrico para dar lugar a la molécula peroxinitrito, un fuerte oxidante. Además, la MPO es capaz de reaccionar con el peróxido de hidrógeno para dar lugar a otras especies reactivas incluyendo ácidos hipohalosos como el ácido hipocloroso. Las ROS que se producen tienen capacidad antimicrobiana (Amulic y cols., 2012; Quinn y cols., 2006).

- Fusión de los gránulos con la membrana del fagosoma. Como se ha visto en el apartado 4.3.1., estos gránulos contienen un gran arsenal de proteínas antimicrobianas que tienen como fin la eliminación de los microorganismos presentes en el fagosoma (Amulic y cols., 2012; Quinn y cols., 2006).

Todos estos procesos tienen lugar en presencia de un pH alcalino que se mantiene gracias a la acción del complejo NADPH oxidasa, y que resulta clave para la actuación de ciertas proteínas presentes en los gránulos, como la EN o la CG (Amulic y cols., 2012).

Finalizado el proceso de fagocitosis, muchos neutrófilos sufren apoptosis. Posteriormente, los restos celulares son eliminados por los macrófagos, evitando así la liberación de proteínas de los neutrófilos que pueden causar daño en el tejido del hospedador (Fox y cols., 2010; Mantovani y cols., 2011).

A pesar de que la eficiencia de este proceso es en general alta, no todos los patógenos son eliminados por fagocitosis de neutrófilos. De hecho, hay estudios en los que se describen diferentes estrategias bacterianas para sobrevivir dentro de los neutrófilos, evadiendo la acción del fagosoma. Por ejemplo, la cápsula de polisacárido de *S. aureus* confiere propiedades antifagocíticas; *Helicobacter pylori*, por su parte, es capaz de interrumpir la diana de anclaje de la NADPH oxidasa en el fagosoma; y otros patógenos, como *Salmonella typhimurium* o *Streptococcus pyogenes*, impiden la fusión de los gránulos con la membrana fagosomal (Urban y cols., 2006).

4.3.3. NETs

Este tercer mecanismo por el cual los neutrófilos pueden eliminar a los patógenos es el último que se ha descrito. En un primer momento se interpretó como un modo de muerte celular diferente a la necrosis y la apoptosis (Takei y cols., 1996). Tras diversos avances en el estudio de este tipo de muerte celular, en 2004 se describió el proceso y se denominó NETosis (Brinkmann y cols., 2004).

Las NETs son estructuras procedentes del neutrófilo que se componen principalmente de ADN, que se libera debido a la descondensación de la cromatina, y proteínas como las histonas y otras procedentes de los gránulos de los neutrófilos: EN, CG, lactoferrina, pentraxina 3, gelatinasa, PR3 y proteína catelicidina (LL-37), que tienen acción antimicrobiana (Figura 4) (Delgado-Rizo y cols., 2017).



Figura 4. NETs. Reconstrucción de la liberación de NETs por un neutrófilo en respuesta a la presencia de un patógeno. Se representa el ADN descondensado en azul y las distintas proteínas formando una red que engloba al patógeno (bacteria flagelada, en rojo). Adaptado de Delgado-Rizo y cols., 2017.

Se conocen hasta la fecha dos tipos de NETosis, suicida y vital (Delgado-Rizo y cols., 2017; Yang y cols., 2016). Los aspectos que las diferencian se describen en la Tabla 3.

El mecanismo mejor conocido por el cual se producen las NETs es el que corresponde a la NETosis suicida. En primer lugar se produce en el neutrófilo una activación por medio de la estimulación de un receptor de tipo TLR, de la fracción constante de la inmunoglobulina (Fc) o de citocinas. Esta estimulación provoca un aumento en la concentración del Ca⁺² en

el citosol, que actúa como cofactor de la peptidil arginasa deaminasa 4 (PAD4), enzima nuclear que provoca la deaminación de las histonas, por medio de su hipercitrulinación (conversión de grupos amino en cetonas), lo que causa una pérdida de cargas positivas, necesarias para la interacción ADN-histonas en la cromatina. La interacción del ligando con los receptores también provoca la activación de la NADPH oxidasa y, como consecuencia, la producción de ROS, que actúan como mensajeros secundarios causando la separación y pérdida de la membrana nuclear, que se desintegra formando pequeñas vesículas y favoreciendo también la activación de la PAD4. Los radicales oxidativos estimulan también a la MPO, que propicia la activación y la translocación de la enzima EN al núcleo, donde desarrolla su actividad proteolítica, ayudando así a la descondensación de la cromatina (Brinkmann y Zychlinsky, 2012; Fuchs y cols., 2007; Metzler y cols., 2011; Naccache y Fernandes, 2016).

Posteriormente, la cromatina se dispersa en el citoplasma donde se mezcla con otras proteínas de los gránulos, especialmente con la EN y la MPO (Papayannopoulos y cols., 2010). El contenido celular se libera al medio externo, provocando, en última instancia, la muerte de la célula.

La NETosis vital es un proceso que ocurre de una forma más rápida que la NETosis suicida, requiriéndose de entre 5 a 60 minutos para que se produzca. En este caso, la liberación del ADN nuclear es debida a cambios morfológicos: crecimiento de la membrana nuclear y liberación de vesículas, descondensación nuclear y disrupción de la membrana nuclear. La gran diferencia respecto al tipo anterior de NETosis radica en que, tras la liberación del núcleo, el resultado no es la muerte de la célula y los neutrófilos pueden continuar el proceso de fagocitosis (Delgado-Rizo y cols., 2017).

| | NETosis suicida | NETosis vital |
|--|--|--|
| Tiempo | 2-4 h | 5-60 min |
| Procedencia del ADN | Nuclear | Nuclear/mitocondrial |
| Procesos que tienen lugar para la liberación del ADN | Deaminación de las histonas, pérdida de interacción histonas-ADN. MPO. | Pérdida de la forma multilobulada del núcleo. Liberación del contenido de los gránulos. |
| Dependencia de ROS | ROS dependiente: citrulinación de las histonas | ROS independiente |
| Viabilidad celular | Muerte de los neutrófilos | Supervivencia de los neutrófilos |

 Tabla 3. Características diferenciales entre NETosis suicida y NETosis vital. Adaptado de Yang y cols.,

 2016.

Aunque diferentes estudios discrepan con respecto al objetivo de la liberación del ADN y proteínas antimicrobianas por parte de los neutrófilos durante la NETosis, se cree que podría tener como principal finalidad la muerte de los patógenos (Brinkmann y cols., 2004).

4.3.3.1. Cuantificación de las NETs experimentalmente

Uno de los principales problemas para el estudio de estas estructuras liberadas por los neutrófilos es que, dada su complejidad y su reciente descubrimiento, aún no existe un consenso sobre cómo analizarlas. Actualmente no se dispone de un método considerado óptimo a este respecto y la combinación de varios ensayos puede ser lo más adecuado. Algunos de los más utilizados se describen a continuación (White y cols., 2017):

- Observación mediante microscopía de fluorescencia

Para ello se utilizan tinciones sencillas de ADN (tales como DAPI, Hoechst 33342 o SYTOX Green), donde se pueden observar y cuantificar las NETs por medio de algoritmos de los programas de análisis de imagen (Brinkmann y cols., 2013; Rodríguez-Espinosa y cols., 2015). Se utilizan también anticuerpos para detectar por microscopía la presencia de proteínas típicas de las NETs, como la EN, las histonas o la MPO.

- Citometría de flujo

Se puede analizar la descondensación del ADN y la presencia extracelular de proteínas como la MPO mediante citometría de flujo, basando el análisis en la expansión del núcleo que se produce durante la NETosis (Masuda y cols., 2017).

- Cuantificación del ADN extracelular por fluorescencia

Se basa en la utilización de algún tipo de tinción específica para el ADN extracelular (como las tinciones comerciales SYTOX Green, SYTOX Orange o Picogreen) que hacen posible cuantificar la cantidad de material genético liberado en las NETs de los neutrófilos. Se trata de un método eficaz, rápido y relativamente sencillo, aunque no permite discernir si el origen

del ADN son las propias NETs u otros restos celulares. Por ello, es necesario establecer de manera muy precisa los controles en estos ensayos (White y cols., 2017).

- PCR cuantitativa (q-PCR)

La cuantificación de determinados genes en un medio en el que presumiblemente se ha producido la liberación de ADN permitiendo así determinar la cantidad de ácido nucleico que ha sido expulsado de las células (Chuah y cols., 2014).

- Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Es una técnica que permite cuantificar de manera muy precisa la concentración en el medio de una proteína determinada. En este caso, se cuantifican aquellas proteínas asociadas con las NETs como la EN, la MPO o la histona H3 citrulinada (Yoo y cols., 2014).

4.4. Interacción con otras células del sistema inmunitario

Una de las principales funciones de los neutrófilos es eliminar a los patógenos. Al ser generalmente una de las primeras células en llegar al lugar en que se produce el daño tisular, tienen también una misión de alerta sobre otras células del sistema inmunitario. Esto se origina por medio de la producción de diversas citocinas que organizan una respuesta más global del organismo frente al patógeno en cuestión. Está comprobado que, tanto los neutrófilos humanos como los murinos, son capaces de producir un gran conjunto de citocinas de diversas familias (Tabla 4) (Tecchio y cols., 2014).

| Quimiocinas CC | CCL2, CCL3, CCL4, CCL17, CCL18, CCL19, | |
|--|---|--|
| | CCL20, CCL22 | |
| Quimiocinas CXC | CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, | |
| | CXCL6, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, | |
| | CXCL12, CXCL13 | |
| Factores estimuladores de colonias | G-CSF, GM-CSF, IL-3, SCF | |
| Citocinas proinflamatorias | IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-7, IL-9, IL-16, IL-17, IL- | |
| | 18, MIF | |
| Citocinas inmunorreguladoras | IFNα, IFNβ, IFNγ, IL-12, IL-21, IL-23, IL-27, | |
| | TSLP | |
| Citocinas antiinflamatorias | IL-1ra, IL-4, TGFβ1, TGFβ2 | |
| Factores angiogénicos y fibrogénicos | VEGF, BV8, HBEGF, FGF2, TGFa, HGF, | |
| | angiopoyetina 1 | |
| Miembros de la superfamilia de los TNF | TNFα, FasL, CD30L, TRAIL, LIGHT, | |
| | Linfotoxina β , APRIL, BAFF, CD40L, RANKL | |
| Otras citosinas | BDNF, NGF, PBEF, anfirregulina, midkina, | |
| | oncostatina M, activina A endotelina | |

Tabla 4. Citocinas producidas por neutrófilos humanos. Adaptado de Tecchio y cols., 2014.

A continuación se detalla la influencia de las citocinas producidas por los neutrófilos sobre diferentes tipos celulares:

- Monocitos y macrófagos

Al tratarse junto con los neutrófilos de las células fagocíticas por excelencia, es necesario que sincronicen su respuesta ante un daño. Como se puede observar en la Tabla 4, los

neutrófilos expresan moléculas quimiotácticas para estos tipos celulares como los ligandos de quimiocinas 2, 3, 19 o 20 (CCL2, CCL3, CCL19 o CCL20). Además, ciertas proteínas presentes en los gránulos de los neutrófilos inducen la extravasación de los monocitos (LL-37, CG, azurocidina). Los neutrófilos también contribuyen al reclutamiento de los monocitos de una manera indirecta a través del endotelio: incrementando la producción de factores de adhesión endotelial, aumentando la adhesión transendotelial o produciendo moléculas quimiotácticas por parte de otras células (Amulic y cols., 2012; Silva y Correia-Neves, 2012).

Una vez resuelta la infección, los macrófagos son capaces de reprimir a los neutrófilos y de asegurar su eliminación *post-mortem* (Amulic y cols., 2012).

- CDs

Los neutrófilos son capaces de reclutar y activar a CDs por medio de la citocina CCL3. También se ha demostrado que pueden inducir la maduración de este tipo celular *in vitro* propiciando la proliferación de linfocitos T colaboradores 1 (Th1) (Amulic y cols., 2012; Bennouna y cols., 2003).

-Células "natural killers" (NK)

La mayoría de estudios a este respecto han sido realizados *in vitro*, donde se ha demostrado una interacción triple entre CDs, neutrófilos y NKs por medio de citocinas y de contacto célula-célula (Amulic y cols., 2012; Costantini y Cassatella, 2011). El hecho de que estas células colocalicen en un mismo punto de la infección con los neutrófilos presupone una interacción entre ellas; aunque es necesaria la realización de estudios adicionales.

- Linfocitos

Los neutrófilos secretan diversas citocinas inmunorreguladoras, entre ellas la interleucina 12 (IL-12) (Tabla 4), que favorecen la diferenciación de las células Th1. Además, producen diferentes moléculas quimioatrayentes de linfocitos T junto con factores que actúan sobre el desarrollo y maduración de los linfocitos B. Del mismo modo, se han demostrado efectos

supresores de los neutrófilos hacia los linfocitos T. Por otro lado, los linfocitos también producen citocinas que estimulan a los neutrófilos, tales como el interferón γ (IFN- γ) (producido por los linfocitos T) o IL-17 (por parte de los linfocitos Th17) que actúan como reguladores de los neutrófilos, aumentando la expresión por parte de ellos de ciertas citocinas (ligando de quimiocina 8 con motivo C-X-C (CXCL8), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y TNF- α) (Amulic y cols., 2012; Leliefeld y cols., 2015).

Teniendo en cuenta todo lo anterior, queda claro que aunque existen algunos estudios sobre las interacciones de *A. baumannii* y neutrófilos, la mayor parte de esta información proviene de estudios con el modelo murino, cuyos neutrófilos presentan diferencias sustanciales con los neutrófilos humanos. Distintos estudios señalan que el neutrófilo puede ser una célula relevante en el control de las infecciones causadas por *Acinetobacter*. Sin embargo, los estudios elaborados con neutrófilos humanos han obtenido resultados contradictorios (Kamoshida y cols., 2015).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS
En la actualidad, la crisis de la resistencia a los antibióticos es un problema grave, de carácter mundial y creciente. Se augura que, de continuar la tendencia actual, a partir del año 2050 se producirán diez millones de muertes anuales debidas a infecciones causadas, en gran medida, por bacterias resistentes a múltiples antibióticos. De confirmarse este dato, las defunciones provocadas por esta causa superarían a las producidas por otras enfermedades como el cáncer.

Especies pertenecientes al género *Acinetobacter* han emergido en los últimos años como importantes patógenos nosocomiales con una alta tasa de resistencia a los antibióticos y una gran persistencia en el ambiente hospitalario.

Aunque la epidemiología y la resistencia a antibióticos de *A. baumannii*, la especie más prevalente en muestras clínicas humanas, han sido ampliamente estudiadas, se conoce poco sobre otros aspectos cruciales como, por ejemplo, su virulencia. Además, estos se encuentran prácticamente inexplorados en otras especies de relevancia clínica como *A. pittii*.

Respondiendo a las necesidades de estudios sobre los mecanismos implicados en la relación H-P, se ha propuesto desarrollar en esta tesis doctoral una investigación multidisciplinar acerca de las interacciones H-P en dos especies de *Acinetobacter*.

En base a lo anterior, los objetivos planteados en la presente tesis doctoral son los siguientes:

Objetivo 1. Estudiar la adherencia, internalización y citotoxicidad de *Acinetobacter* **en células epiteliales humanas de pulmón.** Desarrollar nuevas herramientas para el estudio de interacciones H-P en *Acinetobacter*.

Objetivo 2. Estudiar la interacción de *Acinetobacter* **con células del sistema inmunitario (respuesta inmunitaria innata).** Dentro de este objetivo se han planteado los siguientes sub-objetivos:

2.1. Estudiar la fagocitosis de Acinetobacter por parte de neutrófilos.

2.2. Estudiar la formación de NETs en neutrófilos estimulados por Acinetobacter.

2.3. Estudiar la base genética y molecular de la respuesta inmunitaria de neutrófilos humanos frente a *Acinetobacter*.

2.4. Estudiar la fagocitosis de Acinetobacter por parte de macrófagos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas

Para llevar a cabo este trabajo, se emplearon 9 cepas clínicas aisladas de pacientes del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV) (Santander, España), de las cuales 4 pertenecieron a la especie bacteriana *A. baumannii* y 5 a *A. pittii*. Además, en el estudio se incluyeron 2 cepas de referencia. El nombre y el origen de las mismas pueden observarse en la Tabla 5.

| Número de cepa | Especie bacteriana | Сера | Origen clínico |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| 1 | Acinetobacter baumannii | ATCC [®] 19606 [™] | Orina |
| 2 | Acinetobacter baumannii | HUMV 07-1319 | Exudado de herida |
| 3 | 3 Acinetobacter baumannii | | Esputo |
| 4 Acinetobacter baumannii | | HUMV 06-2790 | Úlcera cutánea |
| 5 Acinetobacter baumannii | | HUMV 04-3743 | Exudado de herida |
| 6 Acinetobacter pittii | | LMG 10559 | Aspirado traqueal |
| 7 Acinetobacter pittii | | HUMV 08-0315 | Esputo |
| 8 Acinetobacter pittii | | HUMV 08-4336 | Exudado de pie diabético |
| 9 Acinetobacter pittii | | HUMV 08-6207 | Exudado de herida |
| 10 | 10 Acinetobacter pittii | | Exudado de herida |
| 11 Acinetobacter pittii | | HUMV 08-6483 | Orina |

Tabla 5. Cepas bacterianas de *Acinetobacter* **utilizadas**. ATCC: Colección americana de cultivo tipo; LMG: Colección de Microorganismos Belga Coordinada; HUMV: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.

Además, han sido utilizadas como controles cepas de otras especies bacterianas en diversos experimentos. Estas cepas se muestran en la Tabla 6.

| Especie | Сера | Origen |
|--------------------------|-----------|-------------------|
| Serratia liquefaciens | HUMV-3250 | Injerto de hueso |
| Corynebacterium striatum | CS-16 | Exudado de herida |
| Pseudomonas aeruginosa | PAO-1 | Herida |

 Tabla 6. Cepas utilizadas como control. HUMV: Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. CS:

 Corynebacterium striatum.

1.1. Condiciones de cultivo y conservación

Todas las cepas utilizadas se cultivaron en medio líquido Luria (Indicia, Thermo-Fisher); además, las cepas de *Acinetobacter* se cultivaron también en medio infusión de cerebro-

corazón (BHI) (Oxoid, Thermo Fisher). Para los ensayos en los que se determinó la susceptibilidad a distintos antibióticos de las cepas, el medio empleado fue Mueller Hinton (Difco, Thermo Fisher), tal y como indican las directrices del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI). La composición de los distintos medios utilizados en gramos por litro de agua destilada se indica en las Tablas 7, 8 y 9.

| Medio Luria | g/l | |
|---------------------------------------|------|--|
| Triptona | 10,0 | |
| Extracto de levadura | 5,0 | |
| Cloruro de sodio | 0,5 | |
| $pH=7,0 \pm 0,2. T^{a} = 25^{\circ}C$ | | |

Tabla 7. Composición del medio Luria.

| Medio Mueller Hinton | g/l | | | |
|---------------------------------------|------|--|--|--|
| Extracto de carne | 2,0 | | | |
| Digerido de caseína de soja | 17,5 | | | |
| Almidón | 1,5 | | | |
| $pH=7,0 \pm 0,2. T^{a} = 25^{\circ}C$ | | | | |

Tabla 8. Composición del medio Mueller Hinton.

| Medio BHI | g/l | |
|---------------------------------------|------|--|
| Infusión de cerebro | 12,5 | |
| Infusión de corazón | 5,0 | |
| Peptona de proteosa | 10,0 | |
| Glucosa | 2,0 | |
| Cloruro de sodio | 5,0 | |
| Fosfato disódico | 2,5 | |
| $pH = 7,4 \pm 0,2. T^a = 28^{\circ}C$ | | |

Tabla 9. Composición del medio BHI.

Las bacterias se cultivaron también en medio Agar Sangre (AS), el cual se compone de Agar Columbia con un 7% de sangre de oveja (Oxoid, Thermo Fisher), o en medio Luria suplementado con Agar (LA) (Agar Bacteriológico Europeo de Laboratorios Conda S.A.; 15 g/l de agua destilada).

| Medio Agar Sangre | g/l | |
|---|------|--|
| Peptona de proteosa | 15,0 | |
| Digestión de hígado | 2,5 | |
| Extracto de levadura | 5,0 | |
| Cloruro de sodio | 5,0 | |
| Agar | 12,0 | |
| $pH = 7,4 \pm 0,2. T^{a} = 25^{\circ}C$ | | |

La composición del AS se detalla en la Tabla 10.

Tabla 10. Composición del medio AS.

Los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 37°C, tanto en estático (medio sólido y líquido) como en agitación (medio líquido). En el caso de los ensayos en agitación, se utilizó una velocidad de 175 rpm en un agitador orbital (MaxQ[™] 4000, Thermo Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

La conservación de las diferentes cepas se llevó a cabo en criotubos mantenidos a una temperatura de -80°C, utilizando un cultivo en medio líquido crecido en agitación durante la noche, "overnight" (O/N) y empleando como agente crioprotector glicerol (Merck) al 20% v/v.

1.2. Caracterización morfológica de las cepas de Acinetobacter

1.2.1 Producción de anticuerpos policionales contra Acinetobacter

Los anticuerpos utilizados en la presente tesis se obtuvieron en la Unidad de Reproducción de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Todo el proceso requerido para la obtención se ha realizado de acuerdo tanto a la norma 86/609/EU de la Unión Europea (UE), como a las normas de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Gobierno de España), para el manejo de animales de experimentación animal. El procedimiento seguido fue el siguiente: en primer lugar, se cultivaron las cepas de referencia de Acinetobacter (cepa nº1: Acinetobacter baumannii ATCC[®] 19606[™] y cepa nº6: Acinetobacter pittii LMG 10559 (Tabla 5)) en agitación durante 24 h a 37°C en medio BHI. Transcurrido ese tiempo, 100 ml de los cultivos se centrifugaron a 2000 g durante 30 min a 4°C en una centrífuga 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Después de descartar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en un matraz con formaldehído comercial (Fluka) al 1% v/v en tampón fosfato salino (PBS) 1×. Esta suspensión se mantuvo en agitación durante 16 h a 4ºC. La suspensión de bacterias (inactivadas) se centrifugó y se lavó 3 veces con PBS 1×. En el lavado final, el pellet se resuspendió en 4 ml de PBS 1× que se mezclaron 1:1 con adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich, Misuri, Estados Unidos). Con esta mezcla, se inoculó subcutáneamente a 2 conejos de la raza New Zealand. A las 2 semanas, se realizó una segunda inyección de una suspensión con la misma composición. Transcurridas 8 semanas desde la primera inyección, se procedió a anestesiar a los conejos utilizando ketamina y xilacina y a la extracción de sangre de los mismos por medio de punción cardíaca. Después de la extracción, los conejos se sacrificaron mediante sobredosis de barbitúricos. El suero se separó del coágulo sanguíneo por centrifugación a 2000 g durante 30 min a 4°C y se almacenó en alícuotas de 1 ml a una temperatura de -20°C.

1.2.2. Inmunofluorescencia

Para la realización de los ensayos de inmunofluorescencia, se siguió el siguiente protocolo de tinción de bacterias en suspensión. En primer lugar, se cultivaron las bacterias durante 24 h en 10 ml de medio BHI en agitación a 37°C. De esos 10 ml se transfirió 1 ml de cada cepa a un microtubo o tubo Eppendorf de 1,5 ml y se centrifugó a 420 g durante 5 min en una minicentrífuga (MiniSpin, Eppendorf). Después de descartar el sobrenadante se procedió a fijar las bacterias resuspendiendo el *pellet* en 200 µl de paraformaldehído (PFA) (Sigma Aldrich) frío al 3,2% en PBS 1×, y se dejó actuar durante 20 min a temperatura ambiente (RT). A continuación, se centrifugó cada tubo durante 5 min a 600 g (MiniSpin, Eppendorf) para retirar el PFA y después se añadieron a cada tubo 100 µl del anticuerpo policional α -*Acinetobacter baumannii* o α -*Acinetobacter pittii* diluido 1:1000 en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma Aldrich) al 1% en PBS 1×, y se dejó actuar durante 20 min. Cada cepa de *Acinetobacter* se incubó con el

anticuerpo correspondiente a su especie (a-Acinetobacter baumannii o a-Acinetobacter *pittii*) y con el anticuerpo correspondiente a la otra especie para observar qué epítopos tenían en común. Transcurridos los 20 min, los tubos se centrifugaron durante 5 min a 620 g; se retiró el sobrenadante, y se lavaron los *pellets* con PBS $1\times$. En ese momento se añadió el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (rojo) obtenido de cabra (policionales anti-IgG de conejo (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos)), a una concentración de 1:1000 en BSA al 1%, preparado en PBS 1×, y se dejó actuar durante 20 min a RT en oscuridad. Para retirar este anticuerpo, de nuevo, los tubos se centrifugaron durante 5 min a 620 g y los *pellets* obtenidos se resuspendieron en 100 µl de PBS 1×. Finalmente, tras otra centrifugación con los mismos parámetros, se resuspendió el pellet en 20 µl de PBS 1×. A continuación, en un cubreobjetos circular (diámetro 15 mm), se añadieron 3 μ l de la suspensión bacteriana teñida y se mezclaron con 3 µl de medio de montaje Fluoroshield (Sigma Aldrich) que contiene DAPI para teñir el ADN de las bacterias. Cada uno de los cubreobjetos circulares se colocó en un portaobjetos, las preparaciones se sellaron con esmalte comercial y se conservaron en oscuridad a 4°C hasta su observación en un microscopio confocal Nikon A1R equipado con láseres de longitudes de onda de 403, 488 y 561 nm. Las imágenes se tomaron con un objetivo ×100 Apo-TIRF con una apertura numérica de 1,49 N/A y procesadas con el software NIS-Elements 3.2. Para la fusión y tratamiento de las imágenes se utilizaron los programas Photoshop CS3 (Adobe) e ImageJ (Fiji).

1.2.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Con el fin de analizar la morfología, tamaño y presencia de apéndices superficiales (fimbrias) en las distintas cepas de *Acinetobacter*, se realizó una tinción negativa y su posterior observación por medio de TEM. En primer lugar, las bacterias se cultivaron O/N a 37°C en 10 ml de medio BHI o medio Luria (agitación) o bien en una placa de AS (estático). Posteriormente, 1 ml de los cultivos líquidos se transfirió a un microtubo Eppendorf de 1,5 ml y, por otro lado, en otros tubos se preparó una suspensión bacteriana en PBS 1× con las bacterias cultivadas en medio sólido AS. Los tubos se centrifugaron a 420 g durante 5 min y los *pellets* se lavaron 2 veces con PBS 1×. A continuación, se añadieron 10 µl de las bacterias resuspendidas en PBS 1× sobre una rejilla de cobre para TEM (Electron Microscopy Sciences, Filadelfia, Estados Unidos) cubierta con formvar y se dejaron sedimentar durante 1 min. Transcurrido este tiempo se retiró el líquido por

capilaridad utilizando un papel de filtro en el lateral de la rejilla y, a continuación, se añadieron 10 µl de ácido fosfotúngstico al 1% preparado en PBS 1×, que se dejó actuar entre 5 y 10 s para teñir las bacterias. Las rejillas se conservaron en oscuridad a RT hasta que las muestras se observaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEM-1011 (JEOL) operando a 80 kV. Las imágenes se trataron y fusionaron por medio de los programas Photoshop CS3 (Adobe) e Image J (Fiji).

1.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La estructura de la superficie de las bacterias también se analizó por medio de SEM. Para ello, las bacterias se cultivaron en placas de 24 pocillos (Nunc) durante 24 h en medio BHI a 37°C sin agitación. Posteriormente, las bacterias se fijaron con glutaraldehído frío (Sigma Aldrich) al 3% durante 20 min a 4°C y se procedió a la deshidratación de las muestras en una serie creciente de acetona (Fisher Scientific) preparada al 30%, 50%, 70%, 90% y 100% v/v en agua destilada. Cada muestra con la acetona correspondiente se incubó a RT durante 10 min (en el caso de la acetona al 100% se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno). Tras estos pasos, se procedió al secado de las muestras para evaporar la acetona, a través del método del punto crítico y se recubrieron las muestras con partículas de oro mediante un pulverizador de iones de capa fina JFC-1100 (JEOL) (pulverización catódica con partículas de oro). Las bacterias se observaron en un microscopio electrónico de barrido Inspect S (FEI Company) operando a un voltaje de 15 kV o 20 kV con distintos aumentos. El secado por punto crítico, la pulverización con partículas de oro y las observaciones mediante SEM se realizaron en el Departamento de Anatomía y Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria.

2. Interacción de *Acinetobacter baumannii* y *A. pittii* con células epiteliales A549

2.1. Cultivo y propagación de la línea celular A549

La línea celular utilizada para realizar los experimentos de adherencia e invasión de *Acinetobacter* a células epiteliales fue la A549 (ATCC[®] CCL-185TM). Se trata de células epiteliales basales procedentes de un adenocarcinoma de un hombre caucásico de 52 años y fueron cultivadas por primera vez en 1972 por D. J. Giard (Giard y cols., 1973).

Las células se cultivaron en medio Dulbecco Eagle modificado (DMEM) (GE Healthcare Hyclone, Thermo Fisher) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher), 2 mM de L-glutamina (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher) y una mezcla de los antibióticos penicilina-estreptomicina al 0,1% (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher) en un incubador a una temperatura de 37°C en una atmósfera con el 5% de CO₂.

Para su propagación, las células se cultivaron en frascos Roux de 75 cm² (Easy Flask 75 Nunclon, Thermo Scientific). Todos los días se observaron en un microscopio invertido y, cuando la confluencia fue igual o superior al 90%, se procedió a realizar un subcultivo celular. Para ello, se aspiró el medio celular, se lavó el cultivo con PBS 1× y se añadieron, por frasco Roux, 4 ml de tripsina (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher) al 0,5%. En ese momento se incubaron a 37°C (temperatura óptima para la actuación de la enzima tripsina) durante aproximadamente 10 min. Cuando se comprobó que las células estuvieran despegadas, se añadió medio de cultivo y se centrifugaron con el fin de obtener un *pellet* de células. Dicho *pellet* se resuspendió en medio de cultivo y las células se repartieron en diferentes frascos de cultivo. Los pases se realizaron cada 2-3 días aproximadamente, hasta un máximo de 9 subcultivos.

2.2. Adherencia e internalización de Acinetobacter en células A549

2.2.1. Cultivo de células A549

Para realizar las infecciones, se prepararon las células A549 en placas de 24 pocillos (Costar) con o sin portaobjetos circulares de 15 mm. Las células se sembraron 12 h antes de los experimentos a una densidad celular de 1.9×10^5 células/pocillo (100% de confluencia, aproximadamente) o de 9.5×10^4 células/pocillo (50% de confluencia,

aproximadamente) en medio sin antibióticos. Las distintas confluencias se plantearon para observar si *Acinetobacter* presentaba preferencia por adherirse a la superficie inerte (cristal o plástico) o a las células humanas. Si *Acinetobacter* se adhiere a las células humanas sería lógico obtener más UFCs en el caso del 100% de confluencia celular; mientras que si, por el contrario, las bacterias prefieren la adherencia a la superficie inerte, se obtendrían más UFCs en los cultivos con 50% de confluencia. Antes de realizar las infecciones se revisó el estado y confluencia de las células.

2.2.2. Cultivo bacteriano

Las bacterias se cultivaron en 10 ml de medio BHI o Luria a 37°C en agitación (175 rpm) durante, al menos 20 h, para conseguir un cultivo en fase estacionaria. Antes de realizar las infecciones, los cultivos se centrifugaron a 1258 g durante 15 min, se resuspendieron en PBS $1 \times$ y se ajustaron a, aproximadamente, $5,5 \times 10^9$ UFCs/ml (D.O._{620nm}=0,5). Las cepas de *C. striatum* y *S. liquefaciens* se cultivaron en el mismo medio y condiciones que *Acinetobacter*.

2.2.3. Infecciones experimentales

Las células A549 se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) o ratio de bacterias por célula eucariota de ~100:1 (placas con 100% de confluencia celular) o ~200:1 (placas con 50% de confluencia celular), infectando con 5 μ l de suspensión bacteriana cada uno de los cultivos. Posteriormente, con el fin de sincronizar las infecciones, se centrifugaron las placas 4 min a 200 *g* y se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante 90 min en el caso de los experimentos de adherencia, y posteriormente, se realizaron los experimentos de recuento de UFCs o inmunofluorescencia.

En el caso de los experimentos de internalización, se seleccionaron 4 cepas: 2 de la especie *A. baumannii* y 2 de la especie *A. pittii* (cepas n°1, n°2, n°8 y n°9 (Tabla 5)) y se calculó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de estas cepas para la gentamicina de acuerdo con las normas del CLSI. Se infectaron las células durante 2 h y, transcurrido el tiempo de infección, el medio se reemplazó por medio con diferentes concentraciones de gentamicina (Gibco, Thermo Fisher) (0 μ g/ml, 75 μ g/ml o 300 μ g/ml) durante otras 2 h.

- **Recuento de UFCs.** Para los experimentos de adherencia, transcurridos los 90 min de infección, las placas se lavaron 3 veces con PBS 1× utilizando 0,5 ml en cada lavado para eliminar las bacterias no adheridas. A continuación, se añadieron 100 µl de Tritón X-100, preparado al 1% en PBS 1×, con el fin de disgregar la membrana celular y liberar las bacterias que pudieran haberse internalizado en las células. Tras dejarlo actuar durante 5 min, se añadieron 400 µl de PBS 1× y se tomaron 100 µl para realizar diluciones seriadas de 1:10 en PBS 1× hasta llegar a una dilución de 10⁻⁴. Por último, se sembraron 10 µl por triplicado de cada dilución en placas de AS o LA que se incubaron a 37°C O/N. La adherencia de las cepas de *Acinetobacter* se calculó como la media del número total de UFCs por el total de UFCs en el inóculo de cada cepa y se expresó como un porcentaje de inóculo recuperado tras la infección. Los experimentos de adherencia se realizaron de forma independiente 5 veces.

En los ensayos de internalización, el recuento se realizó de la misma manera tras finalizar la incubación de las células y las bacterias con gentamicina.

Las medias de las 2 condiciones (100 o 50% confluencia) se compararon estadísticamente por medio de un test t de Student utilizando el paquete estadístico Prism 3.0; p-valores inferiores a 0,05 (p-valor <0,05) se consideraron estadísticamente significativos.

- Inmunofluorescencia. Tras el tiempo correspondiente de infección (90 min), se lavaron las placas siguiendo el mismo procedimiento que para el recuento de UFCs y se añadieron 250 µl de solución fijadora, PFA frío (4°C) al 3,2% durante 20 min a RT. Pasado este tiempo, se retiró el PFA y tras varios lavados con PBS 1×, se mantuvo la placa a 4°C hasta la realización de los ensayos de inmunofluorescencia. Para proceder con la inmunofluorescencia, se realizaron 2 tipos de marcajes: por un lado, un marcaje de las bacterias totales (adherencia) y por otro lado, una tinción diferencial entre bacterias extracelulares e intracelulares (internalización).

Para la inmunofluorescencia de bacterias adheridas, en primer lugar se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0,1% durante 5 min, tiempo tras el cual se lavaron 3 veces y se procedió a añadir los anticuerpos α -*A. baumannii* α -*A. pittii* (preparados en una dilución 1:1000 en BSA-PBS 1×) durante 20 min a RT y en oscuridad. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS 1× y se incubaron otros 20 min con el anticuerpo secundario rojo Alexa Fluor 594 (a una concentración 1:1000 en BSA-PBS 1×). Tras el lavado de este anticuerpo, se incubaron con el anticuerpo Faloidina-Atto 488 (verde) (Sigma

Aldrich), durante 35 min (preparado a una concentración 1:200 en BSA-PBS 1×), que se une fuertemente a las fibras y filamentos de actina del citoesqueleto celular. Posteriormente, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1× y se montaron en portaobjetos con 2 μ l de medio de montaje Fluoroshield (Sigma Aldrich) que contiene DAPI.

Para el caso del doble marcaje, se añadieron los anticuerpos primarios policlonales α -*A. baumannii* o α -*A. pittii* (preparados en una dilución 1:1000 en BSA-PBS 1×) durante 20 min a RT y en oscuridad. Tras realizar 3 lavados con PBS, se añadió el anticuerpo secundario rojo Alexa Fluor 488 (a una concentración 1:1000 en BSA-PBS 1×). Después de realizar 3 lavados con PBS 1× para eliminar el anticuerpo secundario, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0,1% (preparado en PBS 1×) durante 5 min. A continuación, se repitió la incubación con los anticuerpos primarios policlonales α -*A. baumannii* o α -*A. pittii*. Por último, se incubaron los cubreobjetos con el anticuerpo secundario verde Alexa Fluor 594 preparado en cabra, anti-Ig de conejo (a una concentración 1:1000 en BSA-PBS 1×) durante 20 min. De este modo, las bacterias totales quedaron teñidas en rojo y las extracelulares en verde. Después, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1× y se montaron en portaobjetos con 2 µl de medio de montaje Fluoroshield (Sigma Aldrich) que contiene DAPI.

Finalmente, los cubreobjetos, en ambos tipos de marcaje, se depositaron sobre portaobjetos, se sellaron con esmalte y se mantuvieron a 4°C y en oscuridad hasta su observación en el microscopio.

Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Nikon A1R y se obtuvieron las imágenes con los objetivos Plan-Apo ×20 con una apertura numérica de 0,75 N/A, Plan-Fluor ×40 con una apertura numérica de 1,3 N/A o Apo-TIRF ×100 con una apertura numérica de 1,49 N/A y procesadas con el software NIS-Elements 3.2.

- **SEM.** Tras las infecciones, las placas con los cultivos celulares infectados con las distintas cepas (*Acinetobacter* o *Serratia*) se fijaron utilizando glutaraldehído (Sigma Aldrich) al 3% durante 20 min a 4°C. Transcurrido este tiempo, se procedió de la misma manera que en el apartado 1.2.4.

2.3. Citotoxicidad de productos extracelulares (ECPs) de *Acinetobacter* en células A549

2.3.1. Cultivo de células A549

Para realizar este ensayo de citotoxicidad, se prepararon las células A549 en placas de 24 pocillos (Costar, Thermo Fisher) con cubreobjetos circulares de 15 mm de diámetro. Las células se sembraron 14-16 h antes de los experimentos a una densidad celular de $1,2 \times 10^5$ células/pocillo en medio DMEM con FBS y glutamina, sin antibiótico, y se cultivaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante 20 h. Antes de realizar las infecciones se revisó el estado y confluencia de las células.

2.3.2. Cultivo bacteriano

Las bacterias se cultivaron en 10 ml de medio BHI o Luria líquido a 37°C en agitación (175 rpm) durante, al menos, 20 h para conseguir un cultivo en fase estacionaria. Antes de realizar las infecciones, los cultivos se centrifugaron a 1258 g durante 15 min. A continuación, los sobrenadantes se filtraron utilizando un filtro de 0,22 µm para obtener los ECPs sin bacterias.

2.3.3. Ensayo de citotoxicidad

Se añadieron distintas cantidades del filtrado (200, 150, 100, 50 y 0 μ l) en los pocillos que contenían las células, y se incubaron las placas a 37°C 5% de CO₂ durante 24 h. Como control positivo de citotoxicidad, se utilizó una cepa citotóxica de *S. liquefaciens*.

Las células también se infectaron con bacterias (*Acinetobacter* y *S. liquefaciens*) de la misma forma que en ocasiones anteriores.

- Tinción con *MitoTracker*. Tras el tiempo de incubación se realizó una tinción con el colorante *MitoTracker* Red CMX-Ros (Molecular Probes, Eugene, Oregón, Estados Unidos) con el fin de determinar el estado del árbol mitocondrial tras la incubación con los ECPs de las distintas cepas de *Acinetobacter* o de células infectadas con *Acinetobacter* y *S. liquefaciens*. Para ello, se añadió directamente el colorante en cada pocillo a una concentración de 100 nM durante 1 h a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente, las células se lavaron 3 veces con PBS 1× y se fijaron con PFA al 3,2% a RT durante 20 min, tiempo

tras el cual se lavaron otras 3 veces y se dejaron a 4°C hasta la tinción con Faloidina-Atto 488 (verde) (Sigma Aldrich) durante 35 min a una concentración 1:200 (previa permeabilización con Tritón X-100 al 0,1%). Después, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1× y se montaron en portaobjetos con 2 μ l de medio de montaje Fluoroshield (Sigma Aldrich) que contiene DAPI. La observación se realizó en un microscopio confocal Nikon A1R equipado con láseres de longitudes de onda de 403, 488 y 561 nm.

3. Interacciones Acinetobacter-células del sistema inmunitario

3.1. Neutrófilos

3.1.1. Aislamiento de neutrófilos humanos procedentes de sangre

Todos los estudios que implicaron el uso de muestras humanas se llevaron a cabo de acuerdo a los estándares internacionales de ética en la investigación y se aprobaron por el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria (CEIC).

Los neutrófilos se aislaron de sangre venosa total obtenida a partir de voluntarios sanos, tras dar su consentimiento escrito. Para obtener los neutrófilos, se empleó el kit comercial "EasySep Direct Human Neutrophil Isolation kit" (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

La sangre se obtuvo en tubos de heparina de litio (Vacuette), a partir de los cuales se transfirieron 10 ml de sangre a un tubo Falcon de 50 ml (Thermo Scientific), y se añadieron 20 µl de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,5 M. A continuación, se añadieron 500 µl de Isolation Cocktail (50 µl/ml de muestra), que contiene una mezcla de complejos tetraméricos de anticuerpos producidos a partir de anticuerpos monoclonales contra los antígenos de superficie CD2, CD3, CD9, CD19, CD36 y CD56, para la realización de la selección negativa. Al mismo tiempo se añadieron 500 µl del reactivo RapidSpheres, previamente agitado mediante vórtex (50 µl/ml de muestra). La mezcla se homogenizó mediante pipeteo y se dejó incubar a RT durante 5 min. Transcurrido este tiempo se añadieron 40 ml de solución de EDTA 1 mM en PBS 1×, se mezcló todo pipeteando suavemente y, posteriormente, se colocó el tubo en el imán facilitado con el kit, durante 10 min a RT. En este momento, se recogió con una pipeta (de 35 ml) la parte clara de la solución enriquecida en neutrófilos (con precaución, para no disgregar el *pellet* de eritrocitos) y se transfirió a un tubo nuevo de 50 ml, en el cual se añadieron nuevamente 500 µl de RapidSpheres (50 µl/ml de muestra) y se colocó en el imán durante 5 min adicionales a RT. Posteriormente, se volvió a repetir el proceso de retirar la solución clara enriquecida y transferirla a un nuevo tubo de 50 ml tras lo cual se incubó en el imán durante otros 10 min (a RT y sin tapa). De nuevo, se volvió a recoger la solución clara, que se centrifugó a 201 g durante 4 min para obtener ya un *pellet* de neutrófilos que se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher) suplementado con 10% de FBS o 2% de suero humano y se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ en placas de 24 pocillos, que

77

tenían previamente colocados cubreobjetos de vidrio de 15 mm en cada uno de los pocillos.

Los neutrófilos se obtuvieron de al menos 14 voluntarios sanos, y su pureza se comprobó por medio de la observación de la morfología del núcleo celular tras la tinción con el colorante NucBlue (Molecular Probes).

3.1.2. Infecciones experimentales

Para realizar los experimentos de infección de cultivos de neutrófilos humanos, las cepas de *Acinetobacter* se cultivaron durante una noche en 10 ml de medio BHI o Luria en agitación, según las condiciones descritas anteriormente. Los neutrófilos incubados se infectaron con una MOI de aproximadamente ~100:1. En cada experimento, se realizó un recuento del número de UFCs con que se realizaron las infecciones por medio de diluciones seriadas en PBS $1\times$ que se sembraron en AS y se cultivaron durante 24 h, tiempo tras el cual, se procedió a su recuento. Tras infectar los neutrófilos en las placas de 24 pocillos, estas se centrifugaron durante 4 min a 200 *g* para promover la adherencia de las bacterias a las células y sincronizar la infección. Tras esto, las placas se cultivaron a 37°C y en una atmósfera con un 5% de CO₂ a diferentes periodos de tiempo (30 min, 1 h, 2 h, 3 h y 4 h) y se procesaron para diferentes análisis que se detallarán a continuación. En todos los experimentos se añadieron controles negativos de neutrófilos sin estimular.

En otros experimentos, los neutrófilos también se incubaron con el inhibidor de la polimerización de los filamentos de actina, citocalasina D (Sigma Aldrich) en una concentración de 5 μ g/ml durante 30 min antes de la infección. Posteriormente, los neutrófilos se infectaron de la misma forma y se procesaron para inmunofluorescencia.

3.1.3. Fagocitosis

3.1.3.1. Cuantificación de bacterias viables durante la fagocitosis

Para comprobar la viabilidad de las bacterias que se encontraban en el interior de los neutrófilos se realizaron ensayos de protección con gentamicina para la cepa ATCC[®] 19606[™] de la siguiente manera: después de infectar los neutrófilos durante 2 h, se sustituyó el medio RPMI por medio RPMI con gentamicina durante 90 min para eliminar

las bacterias extracelulares. A continuación, se lavó el cultivo con PBS $1\times$, se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0,1% y se procedió a hacer un recuento de las UFCs intracelulares viables por medio de diluciones seriadas en PBS $1\times$ y posterior siembra en placas de LA. Se incluyó también un control del crecimiento de la cepa en medio RPMI sin neutrófilos.

En todos los casos, la viabilidad o el crecimiento de las cepas se calcularon como la media del número total de UFCs dividido entre el inóculo inicial y expresado como porcentaje. Los experimentos se realizaron, al menos, en 4 réplicas independientes.

3.1.3.2. Ensayos de inmunofluorescencia

Tras los diferentes tiempos de infección descritos en el apartado 3.1.2. (desde 30 min a 4 h) los cultivos se lavaron 4 veces con PBS $1\times$ (con el fin de eliminar los neutrófilos y bacterias no adheridos a la superficie del cristal) y se fijaron utilizando PFA frío (4°C) al 3,2% (preparado en PBS $1\times$) durante 20 min a RT.

En ese momento se realizaron diferentes procesos:

Por un lado, se permeabilizó la membrana celular de los neutrófilos empleando Tritón X-100 (preparado al 0,1% en PBS 1×) durante 5 min y, seguidamente, se utilizó el anticuerpo Faloidina Atto 488 (Sigma Aldrich) (preparado al 1:200 en BSA-PBS 1×) para teñir la actina de los neutrófilos y se dejó actuar durante 35 min. Posteriormente, se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo α -*A. baumannii* o α -*A. pittii* (obtenidos tal y como se describe en el apartado 1.2.1. y preparados a una dilución 1:1000 en BSA-PBS 1×) durante 20 min y el anticuerpo secundario rojo Alexa Fluor 594 (a una concentración 1:1000 en BSA-PBS 1×) durante otros 20 min. Todos estos pasos se llevaron a cabo a RT y oscuridad.

Con el fin de determinar si las bacterias que se encontraban en contacto con los neutrófilos eran extra- o intracelulares, se realizó una doble inmunofluorescencia diferencial aplicando primero los anticuerpos α -*Acinetobacter* durante 20 min seguidos del anticuerpo secundario rojo Alexa Fluor 488 durante otros 20 min. Transcurrido este tiempo se permeabilizaron los neutrófilos con Tritón X-100 (preparado al 0,1% en PBS 1×) y se añadió nuevamente el anticuerpo a-*Acinetobacter* durante los mismos tiempos y a la misma concentración, seguido del anticuerpo secundario verde Alexa Fluor 594

durante otros 20 min. Todos estos pasos se llevaron a cabo a RT y oscuridad. De este modo, las bacterias totales se tiñeron de rojo mientras que, las extracelulares, se tiñeron específicamente de verde.

Después, los cubreobjetos se lavaron con PBS $1 \times y$ se montaron en portaobjetos con 2 μ l de medio de montaje Fluoroshield (Sigma Aldrich) que contiene DAPI.

Finalmente, los cubreobjetos, con ambos tipos de marcaje, se sellaron a los portaobjetos con esmalte comercial y se mantuvieron a 4°C y en oscuridad hasta que se observaron en el microscopio.

Las preparaciones se observaron en un microscopio confocal Nikon A1R y las imágenes se obtuvieron con los objetivos Plan-Apo ×20 con una apertura numérica de 0,75 N/A, Plan-Fluor ×40 con una apertura numérica de 1,3 N/A o Apo-TIRF ×100 con una apertura numérica de 1,49 N/A y procesadas con el software NIS-Elements 3.2.

3.1.3.3. SEM

Tras las infecciones, las placas con los cultivos de neutrófilos infectados con las distintas cepas de *Acinetobacter* (Tabla 5) se fijaron utilizando glutaraldehído (Sigma Aldrich) al 3% durante 20 min a 4°C y se procedió a la deshidratación, tinción y observación de la misma forma que se describe en el apartado 1.2.4.

3.1.3.4. Viabilidad de bacterias en los neutrófilos: tinción Live/Dead

La viabilidad de las bacterias que se encontraban en el interior de los neutrófilos se estudió mediante el kit BacLight Live/Dead bacterial viability kit (Molecular Probes). Para ello se añadió, tras realizar infecciones de 1 h, 2 h, 3 h y 4 h, el colorante Live/Dead (1,5 μ l de SYTO 9 y 1,5 μ l de ioduro de propidio por cada ml) en saponina preparada al 0,1% en solución salina 0,9% (este detergente afecta a las membranas de las células eucariotas sin afectar a las de las bacterias) durante 20 min. Posteriormente, los cubreobjetos se observaron en un microscopio confocal Nikon A1R con los siguientes parámetros de excitación: 488 nm (verde) y 561 nm (rojo) y los filtros de emisión: de 500 a 550 nm y

de 570 a 620 nm. Las imágenes se obtuvieron de campos al azar tomadas con un objetivo Apo-TIRF ×100 con una apertura numérica de 1,49 N/A y procesadas con el software NIS-Elements 3.2.

3.1.3.5. Microscopía de célula viva

La fagocitosis también se observó utilizando microscopía de célula viva empleando un microscopio Nikon Eclipse Ti-E (Nikon), equipado con un objetivo PlanFluor $20-40 \times 0.6$ N/A (Nikon) y un incubador de CO₂.

En ese caso los neutrófilos se cultivaron en placas de 6 pocillos (Nunc), en cámaras de 4 pocillos, especialmente preparadas para la microscopía (Ibidi, Martinsried, Alemania), o en placas de 24 pocillos. Se añadió una gota de NucBlue (Molecular Probes) por cada ml de medio para teñir los núcleos y se procedió a realizar la infección como se ha descrito en el apartado 3.1.2., incubando las placas en la cámara acondicionada del microscopio, donde se tomaron imágenes desde el min 30 de infección al min 120. Se tomaron 4 fotografías en distintos campos de cada pocillo cada 2 min, mediante una cámara ORCA-R2 CCD (Hamamatsu) y el software Nis Elements 3.2. Los filtros utilizados para el NucBlue fueron los siguientes: 375-390 nm para la excitación y 420-490 nm para la emisión. Cada una de las imágenes individuales se importó al software de imagen ImageJ para su análisis.

3.1.4. NETs

3.1.4.1. Observación de NETs por inmunofluorescencia

En un primer momento, las NETs se detectaron por medio de inmunofluorescencia, transcurridas 4 h de infección, mediante los anticuerpos descritos en el apartado 3.1.3.2.: Faloidina Atto 488 (Sigma Aldrich) para el citoesqueleto de las células, anticuerpo de conejo α -*Acinetobacter*, anticuerpo producido en cabra α -conejo secundario para teñir las bacterias y DAPI para el ADN.

Se estudió la colocalización del ADN de las NETs con proteínas comúnmente asociadas a estas como son las histonas, que se tiñeron por medio de un anticuerpo policional (conejo α -histona H3, 1:100 (Abcam, ab1791)) durante 30 min, y EN, utilizando el anticuerpo monocional conejo α -EN (Abcam, ab clon 131260), diluido 1:50, durante 40 min. En ambos casos el anticuerpo primario se detectó posteriormente por los anticuerpos policionales secundarios Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594 en una dilución de 1:1000 preparado en BSA-PBS 1× durante 20 min a RT. Después, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1× y se montaron en portaobjetos con 2 µl de medio de montaje Fluoroshield (Sigma Aldrich) que contiene DAPI. Finalmente, los cubreobjetos con ambos tipos de marcaje, se sellaron a los portaobjetos con esmalte comercial y se mantuvieron a 4°C y en oscuridad hasta que se observaron en el microscopio.

Las preparaciones se observaron en el microscopio confocal Nikon A1R y las imágenes se obtuvieron con los objetivos Plan-Apo ×20 con una apertura numérica de 0,75 N/A, Plan-Fluor ×40 con una apertura numérica de 1,3 N/A o Apo-TIRF ×100 con una apertura numérica de 1,49 N/A y se procesaron con el software NIS-Elements 3.2.

3.1.4.2. Observación de NETs por microscopía de célula viva

Para observar la liberación *in situ* de ADN por parte de los neutrófilos se utilizó el colorante SYTOX Green (Invitrogen). El medio de los neutrófilos se sustituyó por medio con el colorante a una concentración de 10 μ M y, posteriormente, se infectaron de la misma manera que se ha descrito en el apartado 3.1.3.5.. Transcurridos 40 min de la infección se procedió a la toma de imágenes cada 2 min con una cámara ORCA-R2 CCD (Hamamatsu) y el software Nis Elements 3.2. Los filtros utilizados fueron los siguientes: 485-520 nm para la excitación y 521-525 nm para la emisión. Cada una de las imágenes

individuales, tomadas cada 2 min, se importaron al software de análisis de imagen, ImageJ.

3.1.4.3. Cuantificación de NETs mediante SYTOX Green

El colorante SYTOX Green también se empleó para cuantificar la inducción de NETs por 4 de las cepas de Acinetobacter (cepa nº1 y cepa nº 4 de A. baumannii y cepa nº6 y cepa nº9 de A. pittii (Tabla 5)). Como control se utilizaron forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) a una concentración de 100 nM (control positivo) o neutrófilos no estimulados incubados durante 4 h (control negativo). Para realizar la cuantificación, transcurrido el tiempo de infección, se añadió 1 U/ml de ADNasa I (Sigma Aldrich) durante 15 min a RT. Para detener la acción de la ADNasa se empleó EDTA a una concentración de 2,5 mM. En este momento, se recogió el sobrenadante en tubos de microcentrífuga y se procedió a su centrifugación durante 10 min a 8000 g. Posteriormente se transfirieron, por duplicado, 150 µl de los sobrenadantes a placas de 96 pocillos de fondo negro (Thermo ScientificTM). Tras esto, se añadió el colorante SYTOX Green a una concentración de 10 µM con el fin de poder teñir así el ADN liberado. Para cuantificar el ADN se empleó un lector de fluorescencia (Synergy HTX, BioTek) utilizando los siguientes parámetros: para la excitación del fluoróforo la longitud de onda fue de 485 nm y el filtro utilizado para recoger la emisión fue de 535 nm. Los experimentos se realizaron 3 veces de forma independiente. El análisis estadístico se llevó a cabo comparando las medias por medio de un test t de Student utilizando Microsoft Excel para Windows. Un p-valor inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

3.1.4.4. Cuantificación de EN

Este ensayo se basa en la actividad enzimática de la EN en el medio de cultivo que es liberada gracias a la acción de la nucleasa S7. Se trata de un ensayo colorimétrico que utiliza un sustrato específico de EN (N-metoxisuccinil-Alanina-Alanina-Prolina-Valina p-nitroanilida), el cual se escinde en presencia de EN para dar lugar a un producto coloreado (4-nitroanilina) que absorbe luz a 405 nm.

Para cuantificar la EN se utilizó un kit de "NETosis" (Cayman Chemical) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La infección se realizó, como en otras ocasiones, con un

tiempo de incubación de 4 h, utilizando controles sin estimular, y controles positivos de PMA presentes en el kit.

Una vez transcurrido el tiempo de infección, se retiró el medio de los neutrófilos y se sustituyó por un tampón (NET Assay *Buffer*) compuesto por medio RPMI y BSA al 1%, así como cloruro de calcio 1 M al 0,01%, con el fin de retirar la EN presente en el sobrenadante. Para despegar las NETs de los pocillos, se añadieron 500 μ l de medio conteniendo nucleasa S7 (15 U/ml) disuelta en el *buffer* que se dejó actuar durante 15 min a 37°C. El sobrenadante resultante se transfirió a tubos de polipropileno donde se añadieron 10 μ l de EDTA para parar la reacción de la nucleasa. Posteriormente, estos se centrifugaron durante 5 min a 300 *g*. El *pellet*, que contenía los restos celulares, fue descartado, y el sobrenadante transferido a otro tubo que se conservó a 4°C hasta realizar el ensayo. Los ensayos se llevaron a cabo por duplicado.

Paralelamente, se prepararon las distintas soluciones para realizar la curva estándar. Para ello, se utilizaron 8 tubos, rotulados del #1 al #8. En los tubos #1 a #7 se añadieron 5 ml de NET Assay *Buffer* y, se transfirieron 10 μ l de la "Solución Bulk estándar" al tubo #1 para conseguir una concentración de EN de 36 mU/ml. A continuación, se hicieron diluciones seriadas 1:2 hasta el tubo #7 de modo que las concentraciones fueron las indicadas en la Tabla 11.

| Tubo | Concentración de EN (mU/ml) |
|-----------|--------------------------------|
| #1 | 36 |
| #2 | 18 |
| #3 | 9 |
| #4 | 4,5 |
| #5 | 2,25 |
| #6 | 1,125 |
| #7 | 0,56 |
| #8 | 0 |

Tabla 11. Concentraciones de la recta patrón del estándar del "NET Assay".

Una vez preparadas las muestras y el estándar, se procedió a cargar una placa de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) con 100 µl de la muestra o del estándar correspondiente. Tras esto, se añadieron 100 µl por pocillo de "NET Assay Neutrophil Elastase Substrate" diluido 1:30; se cubrió la placa y se incubó durante 2 h a 37°C en oscuridad. Por último, se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector Multiskan Fc (Thermo Scientific).

Los datos se analizaron online con el software "MyAssays" eligiendo la opción "Four parameter logistic curve".

3.1.4.5. Cuantificación de histona H3 citrulinada

Para la cuantificación de la histona H3, se realizaron, en primer lugar, las infecciones de neutrófilos siguiendo lo descrito en el apartado 3.1.2.. Así mismo, tras las infecciones, para disgregar las NETs se empleó la ADNasa I tal y como se describió en el apartado 3.1.4.3.. Las muestras de los sobrenadantes se guardaron a 4°C hasta realizar el ensayo de cuantificación.

El protocolo para la cuantificación se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Cayman Chemical). En primer lugar, se prepararon las soluciones correspondientes para hacer la recta patrón. Para ello, se reconstituyó el estándar con Buffer de ELISA (provisto en el kit) a una concentración de 500 ng/ml y se numeraron tubos del #1 al #8. Se añadieron 500 µl de Buffer de ELISA a los tubos del #2 al #8, mientras que al primero de ellos se añadieron 4,9 ml de Buffer de ELISA y 100 µl del estándar, para tener una concentración de 10 ng/ml. Entonces, se procedió a realizar diluciones seriadas 1:2, transfiriendo 500 µl de cada tubo en el siguiente hasta el tubo #7. De este modo, en cada tubo se obtuvieron las concentraciones indicadas en la Tabla 12.

| Tubo | Concentración de H3 (ng/ml) |
|------|--------------------------------|
| #1 | 10 |
| #2 | 5 |
| #3 | 2,5 |
| #4 | 1,25 |
| #5 | 0,62 |
| #6 | 0,31 |
| #7 | 0,15 |
| #8 | 0 |

Tabla 12. Concentraciones de la recta patrón del estándar de histona H3 citrulinada.

Una vez preparadas las muestras y los estándares, se añadieron 100 µl en cada pocillo de la placa proporcionada en el kit, se cubrió la tapa y se incubó durante 2 h en agitación. A continuación, se añadieron 100 µl por pocillo de peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugado, y nuevamente, se cubrió la placa y se incubó durante 1 h en agitación. El siguiente paso fue el lavado de la placa 4 veces: para ello esta se vació por decantación y se añadió Buffer de lavado hasta llenar los pocillos, entre cada uno de los lavados la placa se secó completamente por "tapping". En ese momento, se añadieron 100 µl de Solución Sustrato 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) a cada pocillo, cambiando el color del contenido de los pocillos a azul, se cubrió la placa y se incubó durante 30 min a RT, en oscuridad y agitación. Por último, se añadió la solución de parada HRP virando entonces el color azul a amarillo. El resultado se obtuvo leyendo la absorbancia de la placa a 450 nm en un lector Multiskan Fc (Thermo Scientific).

Los datos se analizaron online con el software "MyAssays" eligiendo la opción "Four parameter logistic curve".

3.1.5. Expresión génica en neutrófilos

3.1.5.1. Extracción del ARN en neutrófilos

Los neutrófilos primarios se purificaron a partir de muestras de sangre utilizando el método de separación negativa EasySep, de la misma forma que en el apartado 3.1.1.. Se realizó la extracción de ARN tanto de neutrófilos control (no infectados con *Acinetobacter*) como de neutrófilos infectados durante 2 h con 2,5 µl de la cepa *A. baumannii* ATCC[®] 19606TM en una atmósfera al 5% de CO₂ y 37°C.

Para realizar la extracción de ARN, se utilizó el kit "Quick-RNA MiniPrep kit" (Zymo Research) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se juntó el medio de 10 pocillos y se rascó el fondo de los mismos, con una punta de pipeta, con el fin de obtener el máximo número de células para la extracción. Los tubos de 15 ml que contenían las células se centrifugaron durante 5 min a 200 g y a RT. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* de células en 300 µl de tampón de lisis, homogenizando el mismo correctamente y mezclando por medio de vórtex. A continuación, se transfirieron los 300 µl a un microtubo de 1,5 ml libre de ARNasas. Dicho tubo se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad en una microcentrífuga (MiniSpin Eppendorf), y el sobrenadante resultante se transfirió a una columna

proporcionada por el kit (de color amarillo) con el fin de eliminar el ADN genómico (ADNg) y se centrifugó a máxima potencia durante 1 min. En el tubo de recogida, se añadieron 300 µl de etanol 96% (Panreac) y se mezclaron bien con el lisado utilizando la pipeta. Los 600 μ l resultantes se transfirieron a una columna verde, que se centrifugó a máxima velocidad durante 30 s y, tras ello, se descartó el líquido conservando la columna. A continuación, se lavó la columna con 400 µl de tampón de lavado, se centrifugó nuevamente durante 30 s a máxima velocidad, conservando la columna y desechando el líquido y se procedió a eliminar el ADN residual por medio del tratamiento con una ADNasa (5 µl) combinada con un tampón de digestión (75 µl), durante 15 min a RT. Tras este tiempo, se centrifugó la columna durante 30 s a máxima velocidad, descartando el líquido. Como últimos pasos, se añadieron 400 µl de tampón Prep y 700 µl de tampón de lavado, centrifugando en cada uno de los pasos durante 30 s a máxima velocidad. En el último lavado, se adicionaron 400 µl de tampón de lavado y se centrifugó la columna durante 2 min a máxima velocidad. Por último, se sustituyó el tubo de recolección por un microtubo libre de ADNasas y ARNasas de 1,5 ml y se añadieron 50 µl de agua libre de ADNasas y ARNasas para recoger el ARN, tras centrifugar 30 s a máxima velocidad. El ARN resultante se conservó a -80°C.

3.1.5.2. Cuantificación del ARN

La cantidad y la calidad del ARN obtenido se testó por medio de un Nanodrop[™] 2000c (Thermo Fisher). Utilizando este aparato se midió, al menos por duplicado, la concentración de ARN presente en cada una de las muestras utilizadas así como la pureza del mismo, evaluando la adecuación de la medida de los ratios de absorbancia de 260/280 nm y 260/230 nm.

3.1.5.3. Eliminación de ADNg y retrotranscripción

En todos los casos, el ADN complementario (ADNc) se obtuvo a partir de 200 ng de ARN extraído de los neutrófilos. Para ello, se utilizó el kit comercial "RT² First Strand" (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En primer lugar, se realizó la eliminación del ADNg de los 200 ng de ARN por medio de un tampón proporcionado en el kit y agua libre de ADNasas y ARNasas. La reacción tuvo lugar en un tubo de PCR estéril y libre de nucleasas, a 45°C durante 5 min en un termociclador Mastercycler pro S (Eppendorf).

A continuación, el ARN purificado resultante se mezcló con el cóctel de transcripción inversa (*Buffer* de retrotranscriptasa $5\times$, primer de la enzima retrotranscriptasa, retrotranscriptasa y agua libre de ADNasas y ARNasas). La reacción de síntesis del ADNc tuvo lugar tras la incubación a 42°C durante 15 min y 95°C 5 min de la mezcla descrita en un termociclador Mastercycler pro S (Eppendorf). Las muestras se mantuvieron en hielo o a -20°C hasta la realización de la q-PCR.

3.1.5.4. Matrices de q-PCR

Para medir la expresión de genes relacionados con la infección y la inflamación en los neutrófilos, se utilizó una matriz comercial de la vía de señalización de los receptores TLRs (Qiagen). Estas matrices están diseñadas para cuantificar, en cada caso, la expresión de 84 genes humanos relacionados con dicha vía (Tabla 13, sombreados en azul y blanco); contienen, además, 5 genes de referencia (Tabla 13, sombreados en naranja); así como diversos controles (Tabla 13, sombreados en verde).

| Posición | Unigen | GenBank | Símbolo | Descripción |
|----------|-----------|-----------|---------|--|
| A01 | Hs.159494 | NM_000061 | BTK | Tirosina quinasa de Bruton |
| A02 | Hs.599762 | NM_001228 | CASP8 | Caspasa 8, cisteín peptidasa relacionada con |
| | | | | apoptosis |
| A03 | Hs.303649 | NM_002982 | CCL2 | Ligando de quimiocinas 2 (motivo C-C) |
| A04 | Hs.163867 | NM_000591 | CD14 | Molécula CD14 |
| A05 | Hs.87205 | NM_005582 | CD180 | Molécula CD180 |
| A06 | Hs.838 | NM_005191 | CD80 | Molécula CD80 |
| A07 | Hs.171182 | NM_006889 | CD86 | Molécula CD86 |
| A08 | Hs.198998 | NM_001278 | CHUK | Hélice-lazo-hélice conservado de la quinasa |
| | | | | ubicua |
| A09 | Hs.236516 | NM_014358 | CLEC4E | Familia 4 del dominio de lectinas tipo C, |
| | | | | Miembro E |
| A10 | Hs.1349 | NM_000758 | CSF2 | Factor 2 estimulador de colonias de |
| | | | | granulocitos-macrófagos |
| A11 | Hs.2233 | NM_000759 | CSF3 | Factor 3 estimulador de colonias de |
| | | | | granulocitos |
| A12 | Hs.632586 | NM_001565 | CXCL10 | Ligando de quimiocinas 10 (motivo C-X-C) |
| B01 | Hs.515146 | NM_016581 | ECSIT | Homólogo a ECSIT (Drosophila) |
| B02 | Hs.131431 | NM_002759 | EIF2AK2 | Factor -eucariota- de iniciación a la traducción |
| | | | | 2-alfa quinasa 2 |

MATERIAL Y MÉTODOS |

| B03 | Hs.181128 | NM_005229 | ELK1 2 | ELK1, miembro de la familia de oncogenes |
|-------------|-------------|--------------|----------|--|
| | | | | ETS |
| B04 | Hs.86131 | NM_003824 | FADD | Proteína de dominio de muerte asociada a Fas |
| B05 | Hs.728789 | NM_005252 | FOS | Homólogo a oncogen murino viral de |
| | | | | osteosarcoma FBJ |
| B06 | Hs.593339 | NM_002128 | HMGB1 | Grupo de caja 1 de alta movilidad |
| B07 | Hs.37003 | NM_005343 | HRAS | V-Ha-ras Homólogo al oncogen viral de |
| | | | | sarcoma Harvey de rata |
| B08 | Hs.728810 | NM_005345 | HSPA1A | Proteína de choque térmico de 70 kDa 1A |
| B09 | Hs.595053 | NM_002156 | HSPD1 | Proteína de choque térmico de 60 kDa 1 |
| | | | | (chaperonina) |
| B10 | Hs.37026 | NM_024013 | IFNA1 | Interferón alfa 1 |
| B11 | Hs.93177 | NM_002176 | IFNB1 | Interferón beta 1, fibroblasto |
| B12 | Hs.856 | NM_000619 | IFNG | Interferón gamma |
| C01 | Hs.597664 | NM_001556 | IKBKB | Inhibidor del polipéptido ligero kappa |
| | | | | potenciador de genes en las celulas B, quinasa |
| <u> </u> | H- 102717 | NIM 000572 | II 10 | Deta |
| C02 | HS.193/1/ | NM_000882 | IL10 | Interleucina 10 |
| 0.05 | HS.075 | NWI_000882 | IL12A | estimulador 1 de "natural killers" factor de |
| | | | | maduración citotóxico de linfocitos n35) |
| C04 | Hs 1722 | NM 000575 | IL1A | Interleucina 1 alfa |
| C05 | Hs 126256 | NM_000576 | IL1B | Interleucina 1 beta |
| C06 | Hs 89679 | NM_000586 | Ш.2 | Interleucina 2 |
| C07 | Hs.654458 | NM 000600 | IL6 | Interleucina 6 (interferón 2 beta) |
| C08 | Hs.624 | NM 000584 | IL8 | Interleucina 8 |
| C09 | Hs.522819 | NM 001569 | IRAK1 | Ouinasa 1 asociada al receptor de |
| | | _ | | interleucinas 1 |
| C10 | Hs.449207 | NM_001570 | IRAK2 | Quinasa 2 asociada al receptor de |
| | | | | interleucinas 1 |
| C11 | Hs.138499 | NM_016123 | IRAK4 | Quinasa 4 asociada al receptor de |
| | | | | interleucinas 1 |
| C12 | Hs.436061 | NM_002198 | IRF1 | Factor 1 regulador de interferón |
| D01 | Hs.75254 | NM_001571 | IRF3 | Factor 3 regulador de interferón |
| D02 | Hs.714791 | NM_002228 | JUN | Proto-oncogen Jun |
| D03 | Hs.36 | NM_000595 | LTA | Linfotoxina alfa (miembro 1 de la superfamilia |
| | | | | de TNF) |
| D04 | Hs.653138 | NM_004271 | LY86 | Antígeno 86 de linfocitos |
| D05 | Hs.660766 | NM_015364 | LY96 | Antígeno 96 de linfocitos |
| D06 | Hs.514012 | NM_002756 | MAP2K3 | Proteína quinasa quinasa 3 activadora de |
| | | | | mitógenos |
| D07 | Hs.514681 | NM_003010 | MAP2K4 | Proteína quinasa quinasa 4 activadora de |
| - | TT / 2000-1 | | 14,00000 | mitógenos |
| D08 | Hs.657756 | NM_005921 | MAP3K1 | Proteina quinasa quinasa 1 activadora |
| D 00 | II. (44140 | NR4 002100 | MADAVA | de mitógenos |
| D09 | HS.644143 | NM_003188 | MAP3K/ | Proteina quinasa quinasa quinasa / activadora |
| D10 | Це 421550 | NM 004924 | MADAVA | de mitogenos |
| 010 | п8.431330 | INIVI_004834 | MAP4K4 | riotema quinasa quinasa quinasa quinasa 4 |
| | | | | acuvadora de mitogenos |

MATERIAL Y MÉTODOS |

| | D11 | Hs.138211 | NM_002750 | MAPK8 | Proteína quinasa 8 activadora de mitógenos |
|---|------------|------------|---------------|--------|--|
| ľ | D12 | Hs.207763 | NM_015133 | MAPK8I | Proteína 3 que interacciona con la proteína |
| | | | | P3 | quinasa 8 activadora de mitógenos |
| | E01 | Hs.82116 | NM_002468 | MYD88 | Proteína tirosina quinasa específica |
| | | | | | de linfocitos |
| | E02 | Hs.654408 | NM_003998 | NFKB1 | Subunidad 1 del factor nuclear potenciador de |
| | | | | | las cadenas ligeras kappa de las células B |
| | | | | | activadas |
| | E03 | Hs.73090 | NM_002502 | NFKB2 | Subunidad 2 del factor nuclear potenciador de |
| | | | | | las cadenas ligeras kappa de las células B |
| | | | | | activadas, p49/p100 |
| | E04 | Hs.81328 | NM_020529 | NFKBIA | Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de |
| | | | | | las cadenas ligeras kappa de las células B |
| | | | | | activadas |
| | E05 | Hs.2764 | NM_005007 | NFKBIL | Similar al inhibidor alfa del factor nuclear |
| | | | | 1 | potenciador de las cadenas ligeras kappa de las |
| | | | | | células B activadas |
| | E06 | Hs.530539 | NM_006165 | NFRKB | Factor nuclear relacionado con proteína de |
| | | | | | unión kappa B |
| | E07 | Hs.591667 | NM_003298 | NR2C2 | Receptor nuclear de la subfamilia 2, grupo C, |
| | | | | | miembro 2 |
| | E08 | Hs.7886 | NM_020651 | PELII | Homólogo a Pellíno 1 (<i>Drosophila</i>) |
| | E09 | Hs.103110 | NM_005036 | PPARA | Receptor alfa activador del proliferador del |
| | | 11 570074 | NB (002 (00 | | peroxisoma |
| | E10 | Hs.5/02/4 | NM_003690 | PRKRA | Proteina quinasa inducible por interferon |
| | F11 | H- 10C294 | NM 000072 | DECCO | activador dependiente de ARN de doble nelice |
| | EH | HS.190384 | NM_000963 | P1052 | (prostaglandina G/H sintasa y siclooviganasa) |
| | E12 | Uc 621996 | NM 002008 | DEI | Homélogo del oneogén avier viral V rel de |
| | E12 | 115.051880 | NWI_002908 | KLL | reticuloendoteliosis |
| | F01 | Hs 502875 | NM 021975 | RELA | Homólogo A del oncogén aviar viral V-rel de |
| | 101 | 115.502075 | 1111_021978 | REET | reticuloendoteliosis |
| | F02 | Hs.103755 | NM 003821 | RIPK2 | Serín treonin guinasa 2 que interactúa con |
| | 102 | | | | receptores |
| | F03 | Hs.532781 | NM_015077 | SARM1 | Alfa estéril conteniendo motivo TIR 1 |
| | F04 | Hs.501624 | NM_021805 | SIGIRR | Inmunoglobulina sencilla y dominio de toll- |
| | | | | | interleucina (TIR) 1 |
| | F05 | Hs.507681 | NM_006116 | TAB1 | Quinasa 1 activadora por TGF-beta / Proteína |
| | | | | | de unión a MAP3K7 |
| | F06 | Hs.505874 | NM_013254 | TBK1 | Quinasa 1 de unión a TANK |
| | F07 | Hs.29344 | NM_182919 | TICAM1 | Molécula adaptadora de receptores de tipo Toll |
| | | | | | 1 |
| | F08 | Hs.710895 | NM_021649 | TICAM2 | Molécula adaptadora de receptores de tipo Toll |
| | | | | | 2 |
| | F09 | Hs.537126 | NM_001039661 | TIRAP | Dominio que contiene la proteína adaptadora |
| | | | | | del receptor Toll-interleucina 1 |
| | F10 | Hs.654532 | NM_003263 | TLR1 | Receptor tipo Toll 1 |
| | F11 | Hs.120551 | NM_030956 | TLR10 | Receptor tipo Toll 10 |
| | F12 | Hs.519033 | NM_003264 | TLR2 | Receptor tipo Toll 2 |
| | | | | | |

| G01 | Hs.657724 | NM_003265 | TLR3 | Receptor tipo Toll 3 |
|-----|-----------|-----------|--------|---|
| G02 | Hs.174312 | NM_138554 | TLR4 | Receptor tipo Toll 4 |
| G03 | Hs.604542 | NM_003268 | TLR5 | Receptor tipo Toll 5 |
| G04 | Hs.662185 | NM_006068 | TLR6 | Receptor tipo Toll 6 |
| G05 | Hs.659215 | NM_016562 | TLR7 | Receptor tipo Toll 7 |
| G06 | Hs.660543 | NM_138636 | TLR8 | Receptor tipo Toll 8 |
| G07 | Hs.87968 | NM_017442 | TLR9 | Receptor tipo Toll 9 |
| G08 | Hs.241570 | NM_000594 | TNF | Factor de necrosis tumoral |
| G09 | Hs.279594 | NM_001065 | TNFRSF | Superfamilia de receptores del factor de |
| | | | 1A | necrosis tumoral, miembro 1a |
| G10 | Hs.368527 | NM_019009 | TOLLIP | Proteína Toll de interacción |
| G11 | Hs.591983 | NM_004620 | TRAF6 | Receptor TNF asociado al factor 6 |
| G12 | Hs.524630 | NM_003348 | UBE2N | Enzima E2N conjugadora de ubiquitina |
| H01 | Hs.520640 | NM_001101 | ACTB | β-actina |
| H02 | Hs.534255 | NM_004048 | B2M | β-2- microglobulina |
| H03 | Hs.592355 | NM_002046 | GAPDH | Gliceraldehído -3- fosfato deshidrogenasa |
| H04 | Hs.412707 | NM_000194 | HPRT1 | Hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 |
| H05 | Hs.546285 | NM_001002 | RPLP0 | Proteína ribosomal grande, P0 |
| H06 | N/A | U26919 | GAC | Control de ADN genómico |
| H07 | N/A | SA_00104 | RTC | Control de la transcripción inversa |
| H08 | N/A | SA_00104 | RTC | Control de la transcripción inversa |
| H09 | N/A | SA_00104 | RTC | Control de la transcripción inversa |
| H10 | N/A | SA_00103 | PPC | Control positivo de la PCR |
| H11 | N/A | SA_00103 | PPC | Control positivo de la PCR |
| H12 | N/A | SA_00103 | PPC | Control positivo de la PCR |

Tabla 13. Genes analizados en la matriz de q-PCR. En azul y blanco se señalan los genes correspondientes a la vía de los TLRs, en naranja los genes de referencia y en verde los controles de la reacción.

Para ello, se dispuso una mezcla compuesta por el ADNc, RT² SYBR Green q-PCR Mastermix (Qiagen) y agua en la placa de la matriz, con un total de 25 µl/pocillo. Se centrifugó la placa durante 1 min a 1000 rpm y se programó el termociclador de tiempo real CFX96 según las especificaciones del fabricante (Tabla 14), añadiendo también una curva de "melting" como control de la correcta amplificación de los fragmentos. Cada una de las condiciones ensayadas (infección 2 h y control) se analizó por triplicado en experimentos independientes.

| Ciclos | Duración | Temperatura | Etapa |
|--------|----------|-------------|------------------------------------|
| 1 | 10 min | 95°C | Activación por calor de la ADN Taq |
| | | | polimerasa |
| 40 | 15 s | 95°C | Recolección de datos de |
| | 1 min | 60°C | fluorescencia |

Tabla 14. Condiciones de los ciclos de q-PCR.

3.1.5.5. Análisis estadístico

Los datos de ciclo umbral (Ct) obtenidos tras la realización de la q-PCR se clasificaron para su posterior análisis en una plantilla del programa Excel, versión 2010. Los resultados se analizaron a través del portal web de análisis de datos de las matrices de q-PCR de Qiagen. El valor máximo de Ct para examinar los resultados se estableció en 35.

Para llevar a cabo este análisis, se seleccionaron manualmente 2 de los 5 genes de los que incluía la matriz como genes de referencia por mantenerse estables en todas las condiciones testadas.

El software analiza los datos de Ct a través del método delta Ct (Δ Ct). El Δ Ct normalizado para cada gen de interés (GDI) se calculó como: Δ Ct= Ct GDI- Ct genes de referencia, para el control y para el infectado por separado. A partir de este dato, se calcula el doble delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) para cada GDI de la siguiente manera: $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct infectado- Δ Ct control. El cambio o *fold-change* de cada GDI comparado con su correspondiente en el grupo control, se calcula como el 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}. El valor obtenido representa los resultados del *foldchange* de una manera biológicamente significativa. Un valor de *fold-change* mayor de 1 indica una regulación positiva o sobreexpresión del gen, y el *fold-regulation* es igual que el*fold-change*. Por el contrario, un *fold-change* menor de 1 indica una regulación negativa o represión de la expresión del gen, y el *fold-regulation* es la inversa negativa del *foldchange*.

El valor de p de cada gen se calculó en base al test estadístico t de Student de los valores del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para cada gen, en los grupos control e infectados. Un valor de p menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Además, este portal web examina los valores Ct de los pocillos control:

- Control de ADNg. Siempre se tiene que comprobar que el Ct de este control sea mayor de 35, lo que indica que el nivel de contaminación es demasiado bajo como para afectar a los resultados de expresión génica.
- b. Controles de la transcripción inversa. Valora el ∆Ct resultante de la resta de la media de los Ct de los controles de transcripción inversa y la media de los Ct de los controles de PCR positivos. Si este es menor de 5 no es evidente la presencia de impurezas que podrían inhibir la transcripción inversa durante la amplificación.

 c. Controles positivos de la PCR. El valor medio de los Ct de estos controles debe ser 20±2 ciclos en cada matriz de q-PCR y no variar más de 2 ciclos entre matrices o grupos de matrices que se comparan.

3.2. Macrófagos

Con el fin de estudiar el comportamiento de *Acinetobacter* frente a estas células también se realizaron infecciones en la línea celular de macrófagos de ratón J774A.1 así como en macrófagos humanos procedentes de monocitos circulantes en sangre.

3.2.1. Línea celular J774A.1

3.2.1.1. Cultivo, propagación y almacenamiento de la línea celular J774A.1

En estos experimentos, se utilizó la línea celular de macrófagos murinos J774A.1 (BALB/c). Las células se cultivaron en DMEM (GE Healthcare Hyclone, Thermo Fisher) suplementado con un 10% de FBS (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher), 2 mM de L-glutamina (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher) y una mezcla de antibióticos de penicilina-estreptomicina al 0,1% (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher). Se cultivaron en un incubador a una temperatura de 37°C, en una atmósfera con el 5% de CO₂.

Para su propagación, las células se cultivaron en frascos Roux de 75 cm² (Easy Flask 75 Nunclon, Thermo Scientific). Todos los días fueron observadas en un microscopio invertido y, cuando la confluencia fue igual o superior al 90%, se procedió a realizar un subcultivo. Para ello, se aspiró el medio celular, se lavó el cultivo con PBS $1 \times$ y se rasparon las células de la superficie utilizando un rascador o "Scrapper" (Thermo Scientific). Las células despegadas se resuspendieron en medio de cultivo fresco y se repartieron en frascos Roux nuevos.

3.2.1.2. Infecciones experimentales

El día antes de la infección, los macrófagos se sembraron en placas de 24 pocillos (Costar) sobre cubreobjetos circulares de 15 mm de diámetro. Paralelamente, 10 ml de cultivo bacteriano se incubaron en medio BHI O/N a 37°C.

En el momento de la infección, la densidad óptica bacteriana se ajustó a 10^8 UFCs/ml y se infectaron los cultivos de macrófagos con 5 µl de la suspensión bacteriana. Posteriormente, se centrifugaron las placas durante 4 min a 200 g y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 90 min o 3 h. Transcurridos estos tiempos de infección, se procedió a lavar 3 veces con PBS 1× (con 500 µl por pocillo en cada lavado) y a fijar las células

con 250 μ l de PFA al 3,2% durante 20 min a RT, tiempo tras el cual se volvió a lavar 3 veces con PBS 1× y, finalmente, se almacenaron las placas a 4°C hasta el momento de realizar las tinciones para inmunofluorescencia.

3.2.1.3. Ensayos de inmunofluorescencia

Las tinciones se realizaron de la misma forma que en el caso de la adherencia a células epiteliales: en primer lugar se permeabilizaron las células con Tritón X-100 al 0,1% durante 5 min, tiempo tras el cual se lavaron los cubreobjetos 3 veces y se procedió a añadir los anticuerpos α -*A. baumannii* o α -*A. pittii* (preparados en una dilución 1:1000 en BSA-PBS 1×) durante 20 min a RT y en oscuridad. A continuación, los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS 1× y se incubaron durante otros 20 min con el anticuerpo secundario rojo Alexa Fluor 594 (a una concentración 1:1000 en BSA-PBS 1×). Tras el lavado de este anticuerpo, se incubaron con el anticuerpo Faloidina-Atto 488 (verde) (Sigma Aldrich) durante 35 min a una concentración 1:200. Este anticuerpo se une fuertemente a las fibras y filamentos de actina del citoesqueleto celular. Después, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1× y se montaron en portaobjetos con 2 µl de medio de montaje Fluoroshield (Sigma Aldrich) que contiene DAPI.

Finalmente, los cubreobjetos se sellaron a los portaobjetos con esmalte comercial y se mantuvieron a 4°C y en oscuridad hasta que se observaron en el microscopio.

Las preparaciones se observaron en el microscopio confocal Nikon A1R y las imágenes se obtuvieron con los objetivos Plan-Apo ×20 con una apertura numérica de 0,75 N/A, Plan-Fluor ×40 con una apertura numérica de 1,3 N/A y se procesaron con el software NIS-Elements 3.2.

3.2.2. Aislamiento y diferenciación de macrófagos de sangre humana

Se realizaron ensayos de infección en macrófagos derivados de monocitos humanos procedentes de sangre de donantes sanos, siguiendo las directrices del CEIC. Para llevar a cabo el procedimiento, se mezclaron sangre y Ficoll Histopaque-1077 (Sigma Aldrich) en un ratio 2:1 respectivamente, en tubos de centrífuga de 15 ml y se centrifugaron

durante 30 min a una velocidad de 800 g en una centrífuga Allegra X-22R (Beckman Coulter).

Posteriormente, se recolectó la capa que contenía las células mononucleares de la sangre y se resuspendió en 15 ml de PBS $1\times$ en un tubo de 50 ml, que se centrifugó durante 10 min a 200 g en la misma centrífuga. Tras 2 lavados en PBS $1\times$, las células se resuspendieron en DMEM (GE Healthcare Hyclone, Thermo Fisher) suplementado con un 10% de FBS (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher), 2 mM de L-glutamina (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher) y una mezcla de antibióticos de penicilinaestreptomicina al 0,1% (Gibco, Life Technologies, Thermo Fisher). Las células se dispusieron en placas de 24 pocillos (Nunc) sobre cubreobjetos de cristal de 15 mm y se cultivaron en un incubador a 37°C, en una atmósfera con el 5% de CO₂. Transcurridas 4 h se retiró el medio y se cambió por medio nuevo para eliminar las células no adherentes. Después, las células se cultivaron durante 10 días en medio que contenía una concentración de 50 ng/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Sigma Aldrich). El medio se cambió diariamente por medio fresco que contenía dicho factor.

Las infecciones y las tinciones de inmunofluorescencia se realizaron de la misma manera que se ha comentado anteriormente. También se realizaron infecciones que combinaban bacterias, macrófagos y neutrófilos en proporción 100:1:1.
RESULTADOS

1. Caracterización morfológica de Acinetobacter baumannii y A. pittii

1.1. Inmunofluorescencia

Para observar la morfología de las cepas se realizaron tinciones de inmunofluorescencia con los anticuerpos específicos producidos contra las dos especies (Figura 5), comprobando la morfología cocobacilar. Además, con el fin de conocer la similitud de los patrones de inmunofluorescencia entre las cepas de las dos especies de *Acinetobacter* utilizadas, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia cruzada utilizando los anticuerpos α -*A. pittii* contra las cepas de *A. baumannii* y viceversa (Figura 6).



Figura 5. Tinción de *Acinetobacter*. Micrografía de microscopía de fluorescencia de la cepa nº1 de *A. baumannii*. Tinción con el suero policional α -*A. baumannii* conjugado con el anticuerpo secundario Alexa-594, a la izquierda. El ADN bacteriano se encuentra teñido en azul con DAPI, imagen central. En la imagen de la derecha se muestra una superposición de ambas tinciones. Magnificación original: ×1000.



Figura 6. Inmunofluorescencias cruzadas. Micrografías de microscopía de fluorescencia de cepas de *Acinetobacter* teñidas con un suero policional homólogo o heterólogo de la especie, conjugado con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594. El ADN bacteriano se encuentra teñido en azul con DAPI. Magnificación original: ×1000.

1.2. SEM y TEM

Como puede observarse en la Figura 7, los análisis de SEM (Figura 7. A.) y de TEM (Figura 7. B.) revelan una morfología variable entre las distintas cepas analizadas, presentando algunas apariencia más cocoide (cepas nº1, nº2 y nº6, Figura 7) y otras, por el contrario, más bacilar (cepa nº7, Figura 7). En las imágenes de TEM se puede apreciar la presencia de fimbrias en la superficie bacteriana, en mayor o menor medida, de todas las cepas analizadas (Figura 7. B.).



Figura 7. Morfología de las cepas analizadas por microscopía electrónica. Micrografías de SEM (A) y TEM (B). De arriba a abajo, las cepas que se muestran son: *A. baumannii* n°1; *A. baumannii* n°2; *A. pittii* n°6; *A. pittii* n°7. Magnificación original: ×15000 (A); ×25000 (B).

2. Interacción de *Acinetobacter baumannii* y *A. pittii* con células epiteliales A549

2.1. Adherencia de Acinetobacter a las células A549

Con el fin de conocer si las bacterias se adherían más a la superficie inerte (plástico o cristal) o a la superficie biótica (células epiteliales A549), se realizaron infecciones a distintas confluencias celulares (100% y 50%) y se hicieron recuentos de las UFCs (Figura 8) y análisis microscópicos (Figura 9).

En ambos casos pudo apreciarse, para la mayoría de las cepas, que las bacterias presentaron más adherencia a las superficies inertes que a las células, ya que el recuento de UFCs fue mayor cuanto menor fue la confluencia celular, no resultando la diferencia entre ambas condiciones estadísticamente significativa (p>0,05). En las imágenes de microscopía, tanto de SEM como de fluorescencia (Figura 9), se observó claramente cómo las bacterias se dispusieron en los espacios libres existentes entre las células y solo en algunas cepas se vieron bacterias claramente en la superficie celular (Figura 9 F-F').



Figura 8. Experimentos de adherencia y recuento de UFCs en *Acinetobacter* **spp.** Las células fueron infectadas durante 90 min y la adherencia de *Acinetobacter* a las mismas se calculó como la media de las de UFCs recuperadas respecto al inóculo inicial. Los experimentos se realizaron con las células infectadas comparando dos confluencias diferentes (100%, representado por las barras rojas en la gráfica y, 50% representado por las barras azules). Los datos están expresados como la media \pm error estándar (SE) de cinco experimentos independientes realizados por duplicado.



Figura 9. Adherencia de las diferentes cepas a las células A549. Fotografías de SEM (A-C) de las cepas *A. baumannii* n°1 (A); *A. pittii* n°8 (B); *A. pittii* n°9 (C). Imágenes de microscopía de fluorescencia (D-F; D'-F') de adherencia de las cepas (*A. baumannii* n° 1 (D, D'); *A. baumannii* n° 5 (E-E'); *A. pittii* n°6 (F, F')) adheridas a las células a distintas densidades (100% de confluencia a la izquierda; 50% a la derecha). La flecha en C. muestra una única bacteria sobre las células. Magnificación original: ×1000 (A); ×1500 (B); ×2500 (C); ×200 (D-F; D'-F'). Barras de escala: 10 µm (D-F; D'-F').

Como control de los experimentos cuantitativos, se utilizó una cepa de *C. striatum*, que presentó una alta adherencia hacia este tipo celular. En este caso, se pudo observar mediante microscopía confocal la presencia de bacterias adheridas y/o internalizadas, observándose un escaso número de bacterias adheridas a la superficie inerte (espacios entre células) (Figura 10. A.). Esto fue comprobado también por el análisis de UFCs, donde el número de bacterias recuperadas tras la infección fue superior en el 100% de confluencia que en el 50% (Figura 10. B.)



Figura 10. Adherencia de *C. striatum* a células A549. Inmunofluorescencias (A) y recuento de UFCs (B) de los experimentos de adherencia. En A, imagen de microscopía de inmunofluorescencia en la que el citoesqueleto de las células está teñido en verde con Faloidina (izquierda) y el ADN de células y bacterias está marcado en azul con DAPI (izquierda y derecha). Magnificación original: \times 200. En B, las células fueron infectadas durante 90 min y la adherencia a las mismas se calculó como la media de las UFCs recuperadas respecto al inóculo inicial. Los experimentos se realizaron con las células infectadas a dos confluencias diferentes (100%, representado por la barra roja en la gráfica y 50% por la barra azul). Los datos están expresados como la media \pm SE de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Además, se observó que el medio de cultivo utilizado en el cultivo de las bacterias no afectó a la adherencia celular (Figura 11), observándose el mismo patrón de adherencia a la superficie inerte (cristal) cuando las bacterias se cultivan en medio Luria o en medio BHI.



Figura 11. Efecto del medio de cultivo en la adherencia de *Acinetobacter* **a las células A549.** Se muestra la adherencia de la cepa nº 5 de *A. baumannii* en medio Luria (izquierda) y BHI (derecha). Las bacterias están teñidas con un antisuero policional y el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 (rojo), el citoesqueleto celular con Faloidina Atto 488 (verde) y el ADN marcado con DAPI (azul). Magnificación original: ×200. Barras de escala: 10 µm.

2.2. Internalización de Acinetobacter en células A549

Para comprobar si existía, a tiempos más largos de infección (3 h), internalización de las cepas de *Acinetobacter* en las células epiteliales, se realizaron varios experimentos. En primer lugar, se llevaron a cabo tinciones de inmunofluorescencia doble en las cuales las bacterias extracelulares quedaban teñidas de verde y rojo (amarillo al superponerse ambos colores), y las intracelulares solamente de rojo (Figura 12). Se puede observar la presencia de un número muy limitado de bacterias o de estructuras de un tamaño menor que las bacterias teñidas en rojo en el interior de las células, principalmente en la cepa nº 9 de *A. pittii*.



Figura 12. Inmunofluorescencia doble de *Acinetobacter* en células A549. Las células infectadas durante 3 h fueron fijadas y procesadas para la tinción de inmunofluorescencia doble. Se observan en amarillo las bacterias extracelulares y, en rojo, las intracelulares; en azul se pueden observar los núcleos celulares teñidos con DAPI. Se muestran imágenes representativas de infecciones con las cepas nº 1 de *A. baumannii* (A) y nº 9 de *A. pittii* (B). Las flechas indican la presencia de bacterias y/o estructuras bacterianas intracelulares. Magnificación original: ×200. Barras de escala: 25 µm.

confirmar de Además, para forma cuantitativa estos experimentos de inmunofluorescencia, se realizó un ensayo de protección con gentamicina a distintas concentraciones. Las CMIs de las cepas testadas al antibiótico gentamicina fueron 2 μ g/ml (cepa n° 1), >256 μ g/ml (cepa n° 2), 2 μ g/ml (cepa n° 8) y 4 μ g/ml (cepa n° 9). En este ensavo se pudo comprobar cómo, en las cepas sensibles al antibiótico, no se recuperaron bacterias tras la infección que pudieran estar protegidas del antibiótico en el interior de las células. Solo se pudo hacer recuento de UFCs en el caso de la cepa nº 2 de A. baumannii que es resistente a este antibiótico (Figura 13).



Figura 13. Ensayos de protección con gentamicina. Recuentos de UFCs añadiendo a los cultivos de A549, infectados durante 2 h con distintas cepas de *Acinetobacter* spp., diversas concentraciones de gentamicina. Los resultados de la internalización se calcularon como la media del recuento de UFCs respecto al inóculo inicial de infección, expresado como porcentaje. Cada ensayo se llevó a cabo en pocillos por duplicado y los datos se expresan como la media \pm desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes.

2.3. Citotoxicidad de Acinetobacter en las células A549

Durante los ensayos microscópicos de adherencia e internalización no se detectó, incluso a tiempos largos de infección (3 h), citotoxicidad en células A549 infectadas con las cepas de *A. baumannii* y *A. pittii*, independientemente de las diferentes condiciones de cultivo. Adicionalmente, se incubaron las células A549 con ECPs obtenidos de cultivos líquidos de las bacterias cultivadas en medios Luria y BHI y no se observó citotoxicidad tras 24 h de incubación (Figura 14). Como control positivo de este experimento, se utilizó una cepa citotóxica de *S. liquefaciens* con la cual se pudo apreciar citotoxicidad en este tipo celular tras 1 h de infección (Figura 15). Además, la tinción con el colorante mitocondrial *MitoTracker* no se mostró alterada por la presencia de las cepas de *Acinetobacter* o sus ECPs, comparándola con el control de la línea celular sin infectar. Para comprobar el daño mitocondrial se utilizó de nuevo la cepa de *S. liquefaciens*, que produjo una disminución notable de la fluorescencia mitocondrial en las células infectadas (Figura 16).



Figura 14. Citotoxicidad de ECPs de *Acinetobacter*. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células epiteliales A549 con el citoesqueleto teñido en verde con Faloidina Atto 488 y el núcleo en azul teñido con DAPI. Células estimuladas durante 24 h con ECPs procedentes de la cepa nº5 de *A. baumannii* (A) y controles de células sin estimular (B). Magnificación original: ×200.



Figura 15. Citotoxicidad de *S. liquefaciens*. Imagen de SEM en la que se muestra la citotoxicidad del control positivo *S. liquefaciens* tras infectar 1 h las células A549 (A); comparado con un control de las células sin infectar (B). Magnificación original: ×1000 (A); ×2000 (B).



Figura 16. Análisis de inmunofluorescencia mitocondrial de la monocapa de células A549. Se muestra la señal de fluorescencia correspondiente a las mitocondrias (*MitoTracker* en rojo), actina del citoesquelo (Faloidina en verde) y ADN bacteriano (DAPI en azul). Control de células sin infectar (A); células expuestas durante 24 h a los ECPs de la cepa nº 1 *de A. baumannii* (B-C); células infectadas 2 h con la cepa nº 1 de *A. baumannii* (D) o *S. liquefaciens* (E); control sin infectar (F). Las flechas en D indican la presencia de bacterias extracelulares y en E, células sanas. Magnificación original: ×200.

3. Interacciones Acinetobacter-células del sistema inmunitario

3.1. Neutrófilos

3.1.1. Fagocitosis

Los neutrófilos humanos infectados por las cepas del estudio (tanto de *A. pittii* como de *A. baumannii*) presentaron bacterias asociadas a partir de los 30 min de infección (Figura 17. a.) y claramente internalizadas a partir de los 60 min de infección (Figura 17. b., c.). A medida que el tiempo de infección aumentaba, la carga bacteriana en el interior de los neutrófilos se hacía mayor. Concretamente, a tiempos de infección de 2 h, se observó una gran cantidad de bacterias en el interior de las células fagocíticas (Figura 17. d.-f.). La actividad fagocítica de los neutrófilos, mediante la demostración de presencia de bacterias intracelulares, se confirmó también mediante microscopía de célula viva (Vídeo 1; Soporte digital).

Además, la señal de fluorescencia correspondiente a la presencia de anticuerpos ligados a las bacterias se atenuaba en el interior de los neutrófilos, mientras que la señal de DAPI (ADN bacteriano) permanecía relativamente estable, lo que indica la degradación de estructuras superficiales en las bacterias cuando se encuentran en posición intracelular (Figura 17. f.).



Figura 17. Contacto y fagocitosis de *Acinetobacter* **en neutrófilos humanos.** Neutrófilos infectados y procesados para tinción de inmunofluorescencia con la cepa nº 1 de *A. baumannii* durante 30 min (a), 1 h (b, c) o 2 h (d-f). Las bacterias fueron detectadas con un antisuero de conejo (en rojo); el ADN aparece teñido en azul con DAPI y el citoesqueleto celular de actina teñido en verde con Faloidina Atto 488 (a-c). Inmunofluorescencia doble que muestra bacterias extracelulares en verde y el ADN marcado con DAPI (azul) (d-f). Se muestran máximas proyecciones (a-b, d-f) y sección transversal (c) de microscopía confocal. La flecha en b indica la presencia de un pseudópodo del neutrófilo en contacto con una bacteria. La flecha en c indica bacterias en el interior del neutrófilo. Magnificación original: ×400 (a); ×600 (b-f). Barras de escala: 5 µm (a); 2 µm (b, d-f).

Asimismo, al realizar los ensayos de protección con gentamicina utilizando la cepa de *A*. *baumannii* nº 1 (Figura 18), se pudo observar una clara disminución de las bacterias intracelulares viables, llegando a ser cercano al 0% el inóculo recuperado cuando se aplicó el antibiótico gentamicina (G) y se permeabilizaron los neutrófilos con Triton X-100 (T) como detergente (Figura 18, G+T+). Esto indica la no viabilidad de las bacterias

que se encuentran en el interior de estas células. Sin embargo, cuando se añadió Triton X-100 pero no gentamicina (Figura 18, G-T+) el número de UFCs contadas fue similar a cuando se realizó el recuento sin añadir ningún tratamiento (Figura 18, G-T-) lo que indica que, las bacterias que se estaban contando en esos dos últimos casos eran las que permanecían proliferando en el medio extracelular.



Figura 18. Ensayo de protección con gentamicina en neutrófilos. La gentamicina se añadió 2 h después de la infección con la cepa nº 1 de *A. baumannii* y se dejó actuar durante otras 2 h, tiempo tras el cual, se permeabilizaron las células (o no, según el caso) y se determinó el número de UFCs intracelulares y totales. G: Gentamicina, T: Tritón. A1: cepa nº 1 inoculada en medio RPMI sin células. Los resultados indican la media de UFCs recuperadas de tres experimentos independientes \pm SD, respecto al inóculo inicial, expresado como porcentaje.

Con el fin de confirmar la muerte intracelular de las bacterias fagocitadas por los neutrófilos *in vivo*, se realizaron tinciones con el colorante Live/Dead, utilizando saponina para permeabilizar la membrana celular, lo que hace a la tinción de las bacterias intracelulares más efectiva y en tiempo real. También de este modo pudo observarse cómo a medida que avanzaba el tiempo de infección, la viabilidad bacteriana en el interior de los neutrófilos se veía disminuida (Figura 19).



Figura 19. Tinción Live/Dead en neutrófilos no fijados. Los neutrófilos se infectaron con las cepas de *Acinetobacter*, se permeabilizaron sus membranas y se realizó una tinción con ioduro de propidio y SYTO 9. En el panel superior aparece la mezcla de canales en los cuales se observan bacterias vivas en verde, muertas en rojo y núcleos eucariotas en rosa. En el panel inferior se muestran los cuadros ampliados, únicamente con el canal rojo donde se observan los núcleos eucariotas y bacterias muertas en rojo. Magnificación original: paneles superiores: ×400; paneles inferiores: ×1000. Barras de escala: 5 µm.

Para comprobar la fagocitosis de *Acinetobacter* por los neutrófilos, se realizaron también observaciones mediante SEM. Tras las infecciones, se comprobó la presencia de prolongaciones del citoesqueleto de los neutrófilos (filopodios) de gran longitud (algunos hasta de 50 μ m). Dichas estructuras se observaron también en los ensayos de inmunofluorescencia (Figura 20) y de videomicroscopía en controles no estimulados (Vídeo 2, Soporte digital).

Para demostrar el papel del citoesqueleto celular en el proceso de fagocitosis, se preincubaron los neutrófilos con el inhibidor de polimerización de actina citocalasina D, lo que impidió la fagocitosis de las cepas de *Acinetobacter* (Figura 21). Este inhibidor también bloqueó significativamente la adherencia de los neutrófilos al sustrato inerte.



Figura 20. Captura y fagocitosis de *Acinetobacter* **por neutrófilos humanos.** Micrografías de SEM (a, c-e) y de inmunofluorescencia (b) de neutrófilos en contacto con la cepa nº1 de *A. baumannii* tras 2 h de infección (a-c) y controles no estimulados (d-e). Se observan filopodios en contacto con bacterias (b-c); * en c, señalan estas estructuras rodeando a las bacterias; las flechas indican la presencia de pseudópodos. En (b) se utiliza un antisuero de conejo para detectar las bacterias (en rojo) mientras que el citoesqueleto está teñido con Faloidina Atto 488 (en verde) y el ADN marcado con DAPI (azul). En (e) se muestra ampliada la zona recuadrada en (d). Magnificación original: ×4000 (a), ×600 (b), ×10000 (c), ×500 (d); ×9000 (e). Barras de escala: 10 µm (a); 5 µm (b,c,e); 100 µm (d).



Figura 21. Efecto del pretratamiento de neutrófilos humanos con citocalasina D. Los neutrófilos se infectaron con la cepa nº 1 de *A. baumannii* durante 3 h. Las bacterias fueron detectadas con un antisuero de conejo (en rojo), el ADN aparece teñido en azul (a) y el citoesqueleto celular de actina se muestra teñido con Faloidina Atto 488 en verde (b). Magnificación original: ×400. Barras de escala: 5 µm.

3.1.2. NETs

3.1.2.1. Observación de NETs por microscopía

A partir de 3 h de infección, se observó cómo algunos neutrófilos llenos de bacterias (en algunas ocasiones habían fagocitado más de cincuenta microorganismos) comenzaban a morir. En ese momento, perdían la morfología nuclear lobulada dando lugar a estructuras globulares o en forma de herradura. Durante la etapa final, algunas células perdían la integridad nuclear y citoplasmática, y finalmente, se producía la liberación de NETs (Figura 22). En ciertas ocasiones, la liberación de NETs parecía ocurrir sin la destrucción aparente de las células. Dichas NETs podrían llegar a formar grandes agregados de hasta 1 mm de longitud (Figura 22. e.). Además, se comprobó también por medio de microscopía confocal como algunas NETs parecen rodear y atrapar a las bacterias (Vídeo 3, soporte digital). La formación de NETs fue variable en función de las cepas utilizadas para las infecciones de neutrófilos. Para confirmar la presencia de estas estructuras, excluyendo una producción o acumulación de ADN bacteriano, se añadieron anticuerpos fluorescentes contra las proteínas histona H3 y EN, mostrando ambas una posición

extracelular que colocalizaba con el ADN de las NETs. Como control de localización de histona H3 en el núcleo y EN en el citoplasma, se realizaron tinciones con sus respectivos anticuerpos en neutrófilos sin infectar (Figuras 23 y 24). Como control positivo de inducción de la liberación de NETs se utilizó la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* (Figura 24. d.). La liberación de NETs también pudo ser observada por microscopía de célula viva tras teñir con SYTOX Green el ADN extracelular liberado por un neutrófilo infectado (Vídeo 4, Soporte digital).



Figura 22. Producción de NETs por parte de neutrófilos humanos infectados con Acinetobacter. Imágenes de SEM (a) e inmunofluorescencias (b-e) de neutrófilos infectados durante 4 h con las cepas nº 1 de *A. baumannii* (a, c-e) o nº 4 de *A. baumannii* (b). En las imágenes de inmunofluorescencia, se utilizó un antisuero de conejo para detectar las bacterias (en rojo) mientras que el citoesqueleto de actina está teñido con Faloidina Atto 488 (en verde) y el ADN marcado con DAPI (en azul). Magnificación original: ×15000 (a); ×600 (b, d); ×400 (c); ×200 (e). Barras de escala: 5 µm (a-d); 100 µm (e).



Figura 23. Análisis de inmunofluorescencia de las NETs (i). Formación de NETs en respuesta a la infección por las cepas nº 6 de *A. pittii* (a) y nº 1 de *A. baumannii* (b-c). Colocalización del ADN de NET teñido con DAPI (azul) con las bacterias (rojo); el citoesqueleto de actina se encuentra teñido con Faloidina Atto 488 (verde) (a). Colocalización de la histona H3 (verde) con el ADN (azul) de la NET (b), izquierda: canal verde; centro: canal azul; derecha: mezcla de canales. Distribución de EN (verde) en la estructura de ADN teñida con DAPI (azul) (c), izquierda: canal verde; centro: canal azul; derecha: mezcla de canales. Distribución de EN (verde) en la estructura de ADN teñida con DAPI (azul) (c), izquierda: canal verde; centro: canal azul; derecha: mezcla de canales. Magnificación original: \times 600 (a); \times 400 (b, c). Barras de escala: 5 µm.



Figura 24. Análisis de inmunofluorescencia de las NETS (ii). Neutrófilos humanos infectados 4 h con la cepa nº 7 de *A. pittii* en los que se muestra el ADN de las NETs teñido con DAPI (azul) con la bacteria (rojo) y el citoesqueleto de actina con Faloidina Atto 488 (verde) (a). Control de anticuerpos en neutrófilos no estimulados de histona H3 (verde) y ADN teñido con DAPI (azul) (b) y EN (rojo) con actina marcada con Faloidina Atto 488 (verde) y ADN teñido con DAPI (azul) (b) y EN (rojo) con actina marcada con Faloidina Atto 488 (verde) y ADN teñido con DAPI (azul) (c). Control de formación de NETs por parte de neutrófilos estimulados por la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* teñida con un antisuero de conejo (rojo), el citoesqueleto de actina marcado con Faloidina Atto 488 (verde) y el ADN con DAPI (azul) (d). Magnificación original: \times 400 (a, d); \times 600 (b, c). Barras de escala: 10 µm (a, c); 5 µm (b, d).

3.1.2.2. Cuantificación de NETs

Una vez confirmada la presencia de las NETs por medio de microscopía, se procedió a cuantificar estas estructuras. En primer lugar, se utilizó el colorante SYTOX Green para teñir y cuantificar el ADN extracelular liberado por los neutrófilos en respuesta a la infección por varias cepas de *Acinetobacter* (Vídeo 4, soporte digital; Figura 25). Como control positivo de la estimulación de neutrófilos y liberación de NETs se utilizó PMA (Figura 25. A.) por medio de microscopía de célula viva. Se observó un aumento significativo en el contenido de ADN extracelular en tres de las cuatro cepas de *Acinetobacter* utilizadas (cepa nº1, cepa nº 4, cepa nº 6 y cepa nº9 (Tabla 5)). Los datos cuantitativos de la medida de ADN extracelular se correspondían con lo observado mediante microscopía (Figura 25. B.).



Figura 25. Análisis de las NETs con SYTOX Green. Datos cualitativos (A) y cuantitativos (B) del ADN de los neutrófilos teñidos con SYTOX Green. Imágenes de fluorescencia en canal verde que indican la presencia de ADN extracelular a 0 y 4 h de infección e imágenes de contraste de fase para observar el contorno celular (A). Datos de la medida de fluorescencia con SYTOX Green en neutrófilos estimulados por distintas cepas, PMA 100 nM y control sin estimular (C en la gráfica) (B). Se muestra la media correspondiente a tres experimentos independientes \pm SD. * indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control sin infectar. *p-valor < 0,05; **p-valor < 0,01.

Por otro lado, se midió la concentración de histona H3 citrulinada y de EN en los neutrófilos estimulados por diferentes cepas (Figura 26). Se obtuvo una concentración mayor de estos productos en los neutrófilos infectados con las distintas cepas que en el control sin estimular (Figura 26).



Figura 26. Medida de la histona H3 citrulinada (A) y EN (B). Concentración de H3 citrulinada en neutrófilos infectados con *Acinetobacter* spp. durante 4 h, y en el control sin estimular (A); y medida de la actividad de la EN infectados con *Acinetobacter* spp. durante 4 h, estimulados con PMA 4 h y control sin estimular (B). Las concentraciones fueron estimadas a partir de las curvas estándar obtenidas en cada caso. Se muestra la media de los valores por duplicado.

3.1.3. Estudios de expresión génica en neutrófilos

Tras los análisis anteriores en los neutrófilos humanos, se realizó el estudio de la expresión génica de una ruta del hospedador clave frente a la infección por *A. baumannii*: la ruta correspondiente a los receptores TLRs. Para ello, se utilizaron matrices de q-PCR

que permiten la cuantificación de la expresión de un gran número de genes. En la Tabla 15, se muestran los resultados del análisis de expresión de genes de la ruta Toll, obtenidos tras comparar la expresión de genes de neutrófilos sin infectar con neutrófilos infectados durante 2 h con la cepa nº 1. De los ochenta y cuatro genes analizados, cuarenta y cuatro resultaron sobreexpresados, y en seis de ellos la diferencia entre células control e infectadas fue estadísticamente significativa (Tabla 16). Solo resultaron reprimidos dos genes (Tabla 15). Sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa en ninguno de ellos. Una visión global de estos resultados se muestra gráficamente (Figura 27) donde se pueden observar los genes sobreexpresados por encima de la línea punteada, indicando algunos de los más relevantes, mientras que los dos genes reprimidos se muestra en azul por debajo de la línea inferior punteada.



Figura 27. Expresión de genes de la ruta Toll. Gráfica de dispersión que compara la expresión de genes correspondientes a la matriz de la ruta de TLRs de neutrófilos humanos control y neutrófilos humanos infectados durante 2 h con la cepa nº1 de *A. baumannii*. Cada círculo representa un gen individual. La línea central indica la expresión de genes sin cambios. Las líneas discontinuas que la limitan indican una diferencia de expresión de 2. Los círculos rojos indican genes sobreexpresados y los círculos azules, genes cuya expresión se ha visto reprimida. Algunos de los símbolos de los genes están señalados en la figura.

| Posición | Símbolo | Fold Regulation | |
|-------------|----------|-----------------|--|
| A01 | BTK | 20,16 | |
| A08 | CHUK | 8 | |
| A10 | CSF2 | 4 | |
| A11 | CSF3 | 12,7 | |
| A12 | CXCL10 | 3,17 | |
| B01 | ECSIT | 20,16 | |
| B02 | EIF2AK2 | 2 | |
| B03 | ELK1 | 5,04 | |
| B05 | FOS | 10,08 | |
| C02 | IL10 | 2 | |
| C04 | IL1A | 32 | |
| C05 | IL1B | 32 | |
| C07 | IL6 | 20,16 | |
| C08 | CXCL8 | 16 | |
| C09 | IRAK1 | 5,04 | |
| C10 | IRAK2 | 3,17 | |
| C11 | IRAK4 | 3,17 | |
| D01 | IRF3 | 2 | |
| D03 | LTA | 3,17 | |
| D04 | LY86 | 16 | |
| D06 | MAP2K3 | 5,04 | |
| D10 | MAP4K4 | 3,17 | |
| D11 | MAPK8 | 2,52 | |
| D12 | MAPK8IP3 | 5,04 | |
| E02 | NFKB1 | 8 | |
| E03 | NFKB2 | 4 | |
| E04 | NFKBIA | 5,04 | |
| E05 | NFKBIL1 | 3,17 | |
| E07 | NR2C2 | 2 | |
| E09 | PPARA | 8 | |
| E11 | PTGS2 | 128 | |
| E12 | REL | 4 | |
| F02 | RIPK2 | 3,17 | |
| F 04 | SIGIRR | 5,04 | |
| F05 | TAB1 | 4 | |
| F06 | TBK1 | 3,17 | |
| F07 | TICAM1 | 6,35 | |
| G02 | TLR4 | 3,17 | |
| G04 | TLR6 | 6,35 | |
| G08 | TNF | 5,04 | |
| G09 | TNFRSF1A | 6,35 | |
| G10 | TOLLIP | 4 | |

| G11 | TRAF6 | 5,04 |
|----------|---------|-----------------|
| H01 | ACTB | 10,08 |
| Posición | Símbolo | Fold Regulation |
| A04 | CD14 | -2,52 |
| E08 | PELI1 | -3,17 |

Tabla 15. Genes sobreexpresados y reprimidos en los experimentos de expresión génica.

| Posición | Símbolo | Fold regulation | p- valor |
|----------|---------|-----------------|----------|
| E11 | PTGS2 | 128 | 0,0077 |
| C05 | IL1B | 32 | 0,0083 |
| C08 | CXCL8 | 16 | 0,0198 |
| E02 | NFKB1 | 8 | 0,0245 |
| G08 | TNF | 5,04 | 0,0158 |
| C10 | IRAK2 | 3,17 | 0,0303 |

Tabla 16. Genes sobreexpresados de una manera estadísticamente significativa. Resultados obtenidos al comparar la expresión génica entre los neutrófilos infectados durante 2 h con la cepa nº1 de *A. baumannii* y el control sin infectar. Se muestran los genes ordenados por el *Fold regulation*.

3.2. Macrófagos

3.2.1. Infecciones en células J774A.1

Para evaluar la respuesta de los macrófagos ante la infección de *Acinetobacter* spp., se utilizó, en primer lugar, la línea celular de macrófagos de ratón J774A.1. En estas infecciones se pudo percibir cómo se producía un cambio morfológico de los macrófagos, los cuales se activaron notablemente tras ser estimulados con el patógeno. Sin embargo, la fagocitosis de las bacterias fue cepa-dependiente y, en la mayoría de los casos, limitada o inexistente (Vídeo 5; Soporte digital; Figura 28).



Figura 28. Interacción de macrófagos J774A.1 con *Acinetobacter*. Inmunofluorescencia de las células J774A.1 expuestas durante 3 h a distintas cepas de *Acinetobacter*. Se muestran la cepa nº 1 de *A. baumannii* (A-B); la cepa nº 6 de *A. pittii* (C) y la cepa nº 7 de *A. pittii* (D). Se utilizó un antisuero de conejo para detectar las bacterias (en rojo) mientras que el citoesqueleto de actina está teñido con Faloidina Atto 488 (en verde) y el ADN está marcado con DAPI (en azul). Magnificación original: × 600 (A, B); × 400 (C, D). Barras de escala: 10 µm.

3.2.2. Infecciones en macrófagos humanos

Por otro lado, en el caso del co-cultivo de macrófagos humanos obtenidos a partir de monocitos circulantes con neutrófilos, tampoco se indujo una fagocitosis importante en

el caso de los macrófagos. Sin embargo, cabe destacar que se produjo una activación reseñable de los mismos (comparado con macrófagos sin estimular) comprobada por la elongación de dichas células. Tras 3 h de infección, aproximadamente el 90% de macrófagos contenían en su interior cinco bacterias o menos, mientras que los neutrófilos se encontraban completamente llenos de bacterias (Figura 29).



Figura 29. Inmunofluorescencia del co-cultivo de macrófagos y neutrófilos humanos infectados por *Acinetobacter.* Los cultivos se infectaron durante 3 h con la cepa nº 1 de *A. baumannii* (a, a'); y la cepa nº 6 de *A. pittii* (b, b'); como control se utilizaron macrófagos sin estimular (C, C'). Se utilizó un antisuero de conejo para detectar las bacterias (en rojo) mientras que el citoesqueleto de actina está teñido con Faloidina Atto 488 (en verde) y el ADN está marcado con DAPI (en azul). Las flechas indican los macrófagos y los *, los neutrófilos (a, a'-b, b'). Magnificación original: ×400. Barras de escala: 10 μm (a, a'-b, b'); 20 μm (C-C').

DISCUSIÓN

1. Caracterización morfológica de Acinetobacter baumannii y A. pittii

Desde hace años el género *Acinetobacter* está ganando importancia en el ámbito clínico debido a la facilidad de ciertas especies, principalmente *A. baumannii*, para adquirir resistencias a diversos antimicrobianos. Esto ha llevado a un estudio exhaustivo de la genética y a la caracterización de estos mecanismos de resistencia. Sin embargo, el conocimiento de los factores de virulencia, patogenicidad e interacciones H-P, hasta ahora, ha sido insuficiente en el caso de *A. baumannii* y prácticamente inexistente en otras especies de relevancia clínica como *A. pittii*.

En el estudio morfológico llevado a cabo en esta tesis doctoral, se ha encontrado una amplia variabilidad fenotípica observándose algunas cepas con formas cocoides y otras totalmente bacilares. En cambio, otras características como la presencia de fimbrias han sido uniformes, independientemente de la cepa y las condiciones testadas (diferentes medios de cultivo y temperaturas). Las fimbrias son estructuras bacterianas que se relacionan con aspectos tan importantes de la patogenicidad como la adherencia, tanto a superficies inertes (formación de biocapas) como a superficies bióticas (células eucariotas o proteínas de matriz extracelular). En este caso, la presencia de fimbrias no mostró relación con la adherencia a las células, lo que indica la complejidad del proceso de adherencia bacteriano, y que otros factores deben ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos.

Por otro lado, los estudios de inmunofluorescencia cruzada permitieron comprobar los patrones antigénicos compartidos entre las dos especies de estudio en este trabajo. Se pudo observar cómo las bacterias se tiñeron completamente con el antisuero realizado para su especie pero no lo hicieron con el antisuero heterólogo, correspondiente a la otra especie. Esto indica la especificidad de los determinantes antigénicos dentro de este género, hecho que resultaría de vital importancia a la hora de buscar una vacuna, ya que lo óptimo sería que la hipotética inmunización fuera efectiva frente a todas las especies potencialmente patogénicas de *Acinetobacter* spp. Por lo tanto, sería importante encontrar en un futuro los determinantes antigénicos compartidos por estas especies.

2. Interacción de Acinetobacter spp. con células epiteliales

2.1. Adherencia de Acinetobacter spp. a células epiteliales A549

A la hora de estudiar la interacción H-P, uno de los primeros pasos que se ha de seguir es el estudio de la interacción de la bacteria problema con células epiteliales. Las células epiteliales representan la primera barrera pasiva del organismo y son las encargadas de producir las primeras señales de alerta ante la presencia de una amenaza externa.

Los estudios anteriores a esta tesis doctoral estaban realizados principalmente en dos tipos celulares, las células NCI-H₂₉₂ (Lee y cols., 2006; Lee y cols., 2008) y la línea A549 (Gaddy y cols., 2009; Smani y cols., 2012; Gaddy y cols., 2012). En ambos casos se trata de líneas epiteliales pulmonares ya que una de las infecciones causadas más comúnmente por *Acinetobacter* es la neumonía. En el caso del presente trabajo, la línea de elección fue A549, que son células humanas epiteliales procedentes de adenocarcinoma alveolar basal, puesto que era la línea celular más accesible dentro de las alternativas existentes. Además, aunque esta línea se había utilizado para probar la adherencia de *A. baumannii*, nunca se había empleado con *A. pittii*.

A diferencia de los resultados publicados por otros autores (Lee y cols., 2006; Lee y cols., 2008; Gaddy y cols., 2009; Smani y cols., 2012; Gaddy y cols., 2012), los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, en las condiciones empleadas, la mayoría de las cepas no presentaban adherencia hacia este tipo celular.

La discrepancia entre los resultados puede deberse a varios factores, como las condiciones de cultivo empleadas, la variabilidad entre las cepas de *Acinetobacter* debida a la gran plasticidad genética (incluso tratándose de la misma cepa de referencia $ATCC^{\textcircled{R}}$ 19606TM, utilizada más frecuentemente) o a ciertos aspectos metodológicos. Es importante señalar que, en la mayoría de estudios previos, los datos de adherencia se obtuvieron a partir de experimentos cuantitativos (recuento de UFCs) en los que no se tiene en cuenta si la adherencia bacteriana se produce a las células o a las superficies inertes (como el plástico o el cristal en que están cultivadas las células), y van acompañados de imágenes de fluorescencia o SEM poco concluyentes. Por eso, se considera esencial que los datos cuantitativos vayan apoyados por otros cualitativos como los presentados en este trabajo. En este sentido, en las imágenes de inmunofluorescencia se observa claramente que no hay adherencia a este tipo celular. De hecho, esto lleva a pensar que el aumento del recuento de UFCs con el tiempo de

infección que describen otros trabajos pueda deberse más a la proliferación de *A. baumannii* en el medio de cultivo de células eucariotas a tiempos largos de infección que a la propia adherencia bacteriana a las células. Con los controles positivos se observa cómo, en el caso de cepas de otras especies bacterianas como *C. striatum*, el patrón es muy distinto y las bacterias se encuentran en la superficie de las células A549. Además, al hacer el recuento de UFCs con esta cepa de *C. striatum*, se encontraron más bacterias en una confluencia celular mayor, a diferencia de lo que ocurría en el mismo experimento para *Acinetobacter*, donde el porcentaje de inóculo recuperado no presentaba una diferencia estadísticamente significativa en las dos confluencias celulares probadas. Esto demuestra que la presencia de células A549 no es relevante en el recuento de UFCs y que, por lo tanto, este parámetro por sí solo no es suficiente para determinar la adherencia bacteriana en células epiteliales. Tras estos experimentos se pone en evidencia que es necesaria la adquisición de imágenes que apoyen los datos de recuento de UFCs para poder llegar a conclusiones sobre la adherencia bacteriana a las células eucariotas.

Finalmente, también es necesario tener en cuenta que las condiciones de cultivo, tanto de las células como de las bacterias, pueden modificar la expresión de los fenotipos bacterianos necesarios para la adherencia.

Por lo tanto, en esta tesis doctoral, se demuestra que bajo las condiciones testadas, las cepas de *Acinetobacter* utilizadas en este estudio no presentaron adherencia a las células A549.

2.2. Internalización de Acinetobacter spp. en células A549

Los estudios previos también señalaban que existía una internalización de las bacterias en las células epiteliales (Choi y cols., 2008; Gaddy y cols., 2012) e incluso se había descrito que la entrada a las células se producía por un mecanismo de tipo "zipper" (Choi y cols., 2008). Tras los experimentos de adherencia realizados en el presente trabajo, este hecho parece bastante improbable ya que la internalización requiere el paso previo de la adherencia que, como se ha visto, no se produce.

Para comprobar que esta hipótesis de no internalización era cierta, se realizaron experimentos a tiempos más largos de infección (3 h) y, posteriormente se llevaron a cabo tinciones de inmunofluorescencia doble. Así, se pudo comprobar que, efectivamente, las bacterias se encontraban en el exterior de las células y solamente, en algunos casos concretos, como la cepa nº9 de *A. pittii*, se encontraba alguna bacteria (en número muy limitado) o fragmentos bacterianos teñidos con el anticuerpo específico en el interior de este tipo celular eucariota.

También se realizaron ensayos de protección con gentamicina. Para estos estudios es muy importante tener en cuenta que muchas de las cepas clínicas de *Acinetobacter* son resistentes a la gentamicina por lo que resulta imprescindible la determinación previa de la CMI de las cepas a dicho antibiótico. Por ejemplo, entre las cepas que se han probado, la cepa n°2 de *A. baumannii* resultó resistente a concentraciones de gentamicina tan altas como 300 μ g/ml. Sin embargo, en el caso de las cepas sensibles, no se encontró ninguna bacteria intracelular después de hacer el recuento de UFCs tras la infección y el posterior tratamiento de las células con gentamicina.

Los resultados de inmunofluorescencia y recuentos de UFCs confirman, por tanto, que bajo las condiciones probadas, no se produjo la internalización de *Acinetobacter* en las células A549.

2.3. Citotoxicidad de Acinetobacter sobre las células A549

En lo que respecta a la citotoxicidad, existen estudios previos que aseguran que la porina Omp38 de *A. baumannii* causa citotoxicidad a nivel mitocondrial y propicia la apoptosis celular en células HEp-2 (Choi y cols., 2008). Esta línea celular en un principio se creía que provenía de un tumor de laringe. Sin embargo, se ha visto que está muy relacionada con las células HeLa y probablemente provenga de una contaminación cruzada con las mismas (Lacroix, 2008).

Otros estudios realizados específicamente en la línea celular A549 asocian a *A. baumannii* con la muerte de este tipo celular epitelial (Smani y cols., 2011). Por el contrario, tal y como se muestra en los resultados de esta tesis, no se encontró citotoxicidad causada por *Acinetobacter* en las mitocondrias de las células A549 utilizando el colorante *MitoTracker*. Una de las principales diferencias con los estudios anteriores son los tiempos de infección empleados, ya que a tiempos tan largos de infección, hasta 24 h, las células pueden sufrir efectos únicamente por la proliferación bacteriana en el medio de cultivo celular eucariota.

Además, en las diversas infecciones realizadas, tanto con las cepas de *Acinetobacter* como con sus ECPs, se pudo observar el mantenimiento de la integridad del ADN nuclear y cómo las células permanecían adheridas a la superficie inerte (plástico o vidrio), lo cual no ocurría en los experimentos con controles positivos de citotoxicidad, en los que se utilizó una cepa citotóxica de *S. liquefaciens*.

De manera interesante, los resultados aquí presentados en esta línea celular coinciden con los obtenidos en otros estudios de virulencia en modelos animales, más concretamente en *Galleria mellonella*, donde se muestra una fuerte relación de la citotoxicidad con el inóculo, resultando la cepa ATCC[®] 17978TM de *A. baumannii* letal, únicamente, a concentraciones altas de inóculo. Sin embargo, no resultó letal cuando se administraba una orden de magnitud menos de bacteria ni altas concentraciones de OMPs a los ejemplares de *G. mellonella* (Peleg y cols., 2009).

Por lo tanto, tras este estudio, se concluye que no se puede generalizar sobre la toxicidad que presentan estas bacterias en las células eucariotas y que, en las condiciones en que se realizaron los ensayos, *A. baumannii* y *A. pittii* no resultaron ser citotóxicas en la línea celular A549.

3. Interacciones Acinetobacter-células del sistema inmunitario

3.1. Neutrófilos

3.1.1. Fagocitosis

Los neutrófilos o PMNs, como primera línea activa de defensa del organismo, son células clave en la respuesta inmunitaria ante agresiones externas como son los patógenos. Aunque ha habido un tiempo en que han recibido menos atención que otras células inmunitarias como los macrófagos, en los últimos años su importancia en la literatura se ha incrementado. Los neutrófilos son capaces de matar a la mayoría de bacterias, no obstante, existen ciertas especies bacterianas capaces de escapar de la acción de estas células inmunitarias.

Diversos estudios realizados en modelos murinos revelaron un posible papel clave de los neutrófilos en la defensa del organismo contra *A. baumannii* (Breslow y cols., 2011; Van Faassen y cols., 2007). Sin embargo, a pesar de que estos estudios son una buena aproximación, es necesario tomar los resultados con prudencia debido a las diferencias existentes entre los neutrófilos humanos y los murinos (Mestas y Hughes, 2004).

Otros autores habían descrito que, en el caso de los neutrófilos humanos, *A. baumannii* es capaz de escapar de la fagocitosis de los neutrófilos (Kamoshida y cols., 2015; Kamoshida y cols., 2016; Kamoshida y cols., 2018).

En el caso de otras especies del género relevantes en la clínica, como *A. pittii*, no se han realizado, anteriormente, experimentos con neutrófilos, ni con modelos animales (murinos) ni humanos.

Dadas las discrepancias existentes hasta la fecha, en la presente tesis doctoral se utilizaron neutrófilos humanos, ya que el trabajo está orientado a la respuesta a *A. pittii* y *A. baumannii* en infecciones humanas. Para asegurar la máxima pureza en el proceso de aislamiento de los neutrófilos a partir de sangre humana, se utilizó el kit comercial EasySep que garantiza un porcentaje de neutrófilos igual o superior al 95% con una mínima alteración de las células, lo que otorga una mayor fiabilidad en los resultados de los experimentos sucesivos en comparación a otros métodos como el aislamiento por dextrano y el gradiente de Ficoll.

En los diversos experimentos realizados, se demostró la fagocitosis de las bacterias por parte de los neutrófilos. A tiempos de infección de 30 min ya se encontraron neutrófilos
reconociendo a las bacterias y, desde ese momento hasta 4 h, se produjo una fagocitosis continua de todas las cepas utilizadas.

Cabe destacar que, tal y como se confirmó por inmunofluorescencia, el bloqueo de la polimerización de actina en los neutrófilos utilizando citocalasina D inhibió la fagocitosis de *Acinetobacter*. Esto indica que este proceso está mediado por el citoesqueleto celular de actina. Además, la morfología de las células tratadas variaba en gran medida (neutrófilos más redondos que no se adherían bien a la superficie del vidrio), señalando que la actina es clave en la adherencia y el movimiento de los neutrófilos.

Por otro lado, las bacterias internalizadas perdían intensidad de tinción con el antisuero desarrollado específico para ellas, lo que señala una rápida degradación de sus antígenos de superficie en el interior celular. De hecho, cuando se analizó la viabilidad bacteriana en el interior de los neutrófilos por medio de microscopía confocal (utilizando el kit comercial Live/Dead) en preparaciones sin fijar, se pudo observar que a tiempos cortos de infección (1 h) predominaban los microorganismos vivos. Por el contrario, a medida que avanzaba el tiempo de infección, aumentaba en el interior de los neutrófilos el número de bacterias muertas, teñidas de rojo. Los ensayos de protección con gentamicina también demostraron que las células bacterianas que se encontraban en el interior de los neutrófilos no eran viables.

Los resultados demuestran que *A. baumannii* y *A. pittii* mueren fagocitadas en el interior de los neutrófilos humanos *in vitro*. Estos resultados contrastan con los estudios mencionados anteriormente (Kamoshida y cols., 2015; Kamoshida y cols., 2016). Las discrepancias con los otros trabajos que utilizan *A. baumannii* pueden ser debidas a diferencias en el procedimiento tales como el tiempo de contacto con la célula (1 h en el caso de esos trabajos y 4 h en este estudio). Por otro lado, los resultados de este trabajo se correlacionan con los de estudios *in vivo* realizados en modelos murinos y de pez cebra (Van Faassen y cols., 2007; Breslow et al., 2011; Bhuiyan y cols., 2016).

Adicionalmente, se observó también mediante SEM, microscopía confocal y microscopía de célula viva, la presencia de prolongaciones citoplasmáticas o filopodios en la superficie de los neutrófilos. Estas estructuras son abundantes y han sido extensamente estudiadas en el caso de otras células inmunitarias como los macrófagos (Kress y cols., 2007). Sin embargo, en el caso de los neutrófilos no se ha dilucidado

completamente su papel en la fagocitosis o quimiotaxis. Entre las observaciones realizadas en este trabajo, destacan estas estructuras emergiendo de los neutrófilos y actuando como "sensores" que ayudan a las células a reconocer la superficie a la que adherirse (vidrio) y a las bacterias a las que posteriormente fagocitan. Un futuro estudio sobre estos filopodios, para dilucidar las reordenaciones citoplasmáticas y su papel en quimiotaxis, resultaría importante para aumentar el conocimiento sobre estas células y, por tanto, su interacción con diversos patógenos.

3.1.2. NETs

Se observó a tiempos largos de infección (tras haber transcurrido 3 o 4 h) que los neutrófilos se encontraban llenos de bacterias. En este momento, algunos de ellos comenzaban a morir, llevando a cabo un tipo de muerte celular denominada NETosis.

La NETosis es un proceso complejo que tiene lugar cuando los neutrófilos liberan parte de su contenido nuclear: ADN e histonas, y citoplasmástico: proteínas de los gránulos como CG, MPO y EN (Papayannopoulos y cols., 2010). Finalmente se produce, en la mayoría de los casos, la muerte de la célula. Aunque este proceso se ha descrito en otras células, los neutrófilos han sido las primeras en las que se pudo observar y donde más ampliamente ha sido estudiado (Brinkmann y cols., 2004).

Estas estructuras, conocidas como NETs, compuestas por el contenido celular, son capaces de englobar y atrapar a los patógenos contribuyendo a su inmovilización y, según la mayor parte de los autores, también a su eliminación debido al arsenal de proteínas antibacterianas que liberan (Brinkmann y cols., 2004). Sin embargo, existen ciertos trabajos en los que se asegura que no se produce la muerte de la bacteria en estas estructuras (Menegazzi y cols., 2012).

En el presente trabajo, la presencia de las NETs se pudo comprobar con la mayoría de las cepas testadas, en mayor o menor medida, sin que existiera una dependencia de la especie (*A. baumannii* y *A. pittii*), de la superficie de cultivo de las células (plástico, vidrio) o de la presencia de suero humano o bovino en el medio de cultivo celular.

En base a la literatura existente, el aspecto metodológico de la observación y cuantificación de las NETs suscita controversia (White y cols., 2017). A pesar de que existen diversos métodos para ello (observación y cuantificación del ADN por microscopía de fluorescencia, cuantificación de la fluorescencia, tinción de proteínas de las NETs con inmunofluorescencia, cuantificación de las proteínas por ELISA), ninguna de estas técnicas está establecida como la definitiva o "gold standard". Por ello, en este trabajo se consideró oportuno llevar a cabo varios de ellas: observación con microscopía confocal del ADN de las NETs teñido con DAPI, tinción de histonas y EN por inmunofluorescencia, observación de la liberación del ADN con SYTOX Green en microscopía de célula viva, cuantificación de la fluorescencia del SYTOX Green y ELISA para cuantificar la concentración de la histona H3 citrulinada y de la EN. Por medio de estos experimentos se comprobó cualitativa y cuantitativamente la liberación

de NETs por parte de los neutrófilos en contacto con diferentes cepas de *Acinetobacter*. En todos ellos, especialmente en los experimentos cuantitativos, se establecieron controles bien definidos, utilizando neutrófilos sin estimular (control negativo), la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* o el reactivo PMA (como controles positivos), los cuales ya han sido definidos en diversos estudios como estimuladores de la producción de NETs (Takei y cols., 1996; Yoo y cols., 2014).

Otro aspecto importante es utilizar siempre la misma superficie, tanto para las infecciones bacterianas como para los controles no estimulados, con el fin de fijar estos últimos como límite de producción espontánea de las NETs. En este caso se utilizó vidrio, sustrato que, según algunos autores, puede llegar a activar a los neutrófilos (Naccache y Fernandes, 2016). Las células sin estimular cultivadas en este estudio sobre vidrio no presentaron características de activación (adherencia fuerte al sustrato y morfología ameboidea).

Los resultados positivos de la presencia de NETs contrastan con los obtenidos por otros autores con neutrófilos humanos (Kamoshida y cols., 2015; Kamoshida y cols., 2018) que atribuyen a *A. baumannii* una inhibición de las NETs. Otros autores han tratado de inducir la formación de NETs usando moléculas inmunomoduladoras (claritromicina) en infecciones por *A. baumannii* (Konstantinidis y cols., 2015).

Tras obtener resultados positivos en todos estos ensayos, se puede concluir que las cepas de *A. pittii* y *A. baumannii* indujeron la producción de NETs a tiempos de 4 h de infección. Dicha producción de NETs variaba en función de la cepa utilizada y fue siempre inferior a la que estimulaban los controles positivos.

136

3.1.3. Expresión génica en neutrófilos infectados con Acinetobacter

La extracción del ARN en neutrófilos conlleva algunos problemas. En primer lugar, los neutrófilos poseen 10-20 veces menos ARN que otros leucocitos. Por este motivo, el proceso de aislamiento de los neutrófilos, a partir de sangre periférica, para esta técnica debe garantizar la máxima pureza para poder atribuir los resultados a la expresión génica de los neutrófilos y no a otros leucocitos contaminantes (un porcentaje pequeño de otros leucocitos puede suponer un alto grado de contaminación de ARN) (Tecchio y cols., 2014).

Otro aspecto crítico a la hora de llevar a cabo la cuantificación de la expresión génica, es la elección de genes "housekeeping" o de mantenimiento. En relación a esto, es necesario elegir genes que se mantengan estables en las condiciones experimentales que se elijan ya que se ha descrito que en los neutrófilos no todos los genes "housekeeping" que se utilizan de forma común en otros tipos celulares son estables en ellos (Zhang y cols., 2005). En este caso, se utilizaron los genes β -2-microglobulina (*B2M*) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*), cuyo Ct no variaba en los diversos experimentos llevados a cabo.

Los experimentos de expresión génica realizados en este trabajo se llevaron a cabo infectando los neutrófilos con la cepa de referencia *A. baumannii* ATCC[®] 19606TM durante 2 h. Transcurrido ese tiempo se realizó la extracción de ARN, la retrotranscripción a ADNc y el análisis de expresión génica utilizando una matriz para los genes de la vía de los receptores TLRs. Esta matriz fue elegida debido a la importancia que tienen estos receptores y a las vías biológicas que activan en los neutrófilos en respuesta a la presencia de un patógeno (Prince y cols., 2011).

Al realizar los análisis de expresión génica, se obtuvo como resultado la sobreexpresión significativa de los genes: *PTGS2, IL1B, CXCL8, NFKB1, TNF* e *IRAK2*.

El primero de los genes, fuertemente sobreexpresado fue el de la prostaglandinaendoperoxida sintasa 2 (*PTGS2*) que codifica la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), la cual cuenta con actividad peroxidasa. Esta fuerte sobreexpresión representa una prueba de la activación de los neutrófilos humanos en respuesta a la infección por *A*. *baumannii*, que se había comprobado en experimentos anteriores. Se ha descrito su expresión en neutrófilos humanos con otros patógenos como *Helicobacter pylori* (Kim y cols., 2001). Además, el papel de la enzima que codifica este gen ha sido relacionado, en modelos murinos, con la dispersión de la respuesta inmunitaria en el organismo (Yang y Unane, 2013). La inhibición de COX-2 en neutrófilos humanos se ha utilizado como herramienta para frenar una respuesta proinflamatoria desmedida por parte de los neutrófilos (Kimura y cols., 2003).

El siguiente gen sobreexpresado codifica para la citocina proinflamatoria IL-1 β , un importante mediador en la respuesta a agresiones externas como pueden ser los patógenos. Esta molécula cuenta con varias funciones, todas destinadas a estimular la respuesta inmunitaria frente al daño externo (López-Castejón y Brough, 2011), tales como el reclutamiento de leucocitos al sitio de daño, la amplificación de la respuesta linfocitaria, la aparición de fiebre por medio de la activación de las prostaglandinas, la potenciación de la activación de los neutrófilos y la estimulación de la producción de IL-6 (López-Castejón y Brough, 2011). Sin embargo, esta respuesta de forma mantenida puede tener efectos negativos en el organismo. Estudios realizados anteriormente revelaron la producción de esta citocina por parte de neutrófilos humanos en respuesta al LPS (Park y cols., 2003), a bacterias como *E. coli* (Subrahmanyam y cols., 2001) y también a LPS procedente de *A. baumannii* (Ubagai y cols., 2015). La sobreexpresión de los mismos y la respuesta proinflamatoria desencadenada ante *A. baumannii*.

Asimismo, el gen *CXCL8*, que codifica la quimiocina del mismo nombre, aparece sobreexpresado en los resultados de las matrices. A esta quimiocina también se la conoce como IL-8 o factor quimiotáctico de neutrófilos, y se la ha atribuido un papel proinflamatorio. Una de sus principales funciones consiste en favorecer la expresión de proteínas que potencian la quimiotaxis y adherencia de los neutrófilos para contribuir de ese modo a la activación de los mismos. La producción de esta molécula ha sido descrita en otros tipos celulares como células epiteliales, endoteliales, monocitos o macrófagos. En el caso de los neutrófilos existen algunos autores que señalan su expresión en respuesta a LPS (Park y cols., 2003); mientras que otros no encuentran aumento significativo en su expresión tras la estimulación con LPS procedente de distintas bacterias (Ubagai y cols., 2015). Cabe pensar que, ante una agresión externa como es la infección por *A. baumannii* en el caso de este trabajo, la producción de un factor de reclutamiento de neutrófilos por ellos mismos pretenda tener un "efecto llamada" para atraer al sitio de infección a más células para combatir la infección.

138

El gen *NFKB1*, que codifica la subunidad 1del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B), también resultó sobreexpresado en este estudio. Se trata de un factor regulador de la transcripción de genes, con papel en muchas de las células del organismo y con una importancia señalada en la activación de las células inmunitarias. En reposo, este factor se encuentra inhibido en el citoplasma y, ante un estímulo, una vía celular activada hace que se separe de su inhibidor, I κ B, y entre en el núcleo, activando la transcripción de este gen tan importante a la hora de regular la producción de proteínas proinflamatorias remarca una vez más la importante activación y puesta en marcha de una respuesta proinflamatoria de los neutrófilos a la infección por *A. baumannii*.

El gen *TNF* codifica para la proteína TNF α , una citocina proinflamatoria que se relaciona con diversas funciones en respuesta a la infección, entre las que se encuentran la quimioatracción de neutrófilos o la activación de macrófagos. La sobreexpresión de este importante gen muestra una vez más la activación de los neutrófilos en respuesta a *A. baumannii*. Autores anteriores han descrito la expresión de *TNF* en este tipo celular cuando los neutrófilos eran estimulados con LPS (Park y cols., 2003; Ubagai y cols., 2015).

El último de los genes que se encontraron significativamente sobreexpresados es *IRAK2* que codifica la quinasa 2 asociada al receptor de interleucina 1 (IRAK 2). Esta quinasa, junto con otras de su familia, contribuye a la activación de los neutrófilos y la respuesta provocada por ellos (Auron, 1998).

Tras estos resultados, se puede confirmar la activación molecular de los neutrófilos en respuesta a *A. baumannii*. Sin embargo, todavía se pueden obtener más detalles de dicha respuesta ya que los genes sobreexpresados de manera significativa son los que se encuentran por debajo de la vía del TLR4, que reconoce, entre otros ligandos, el lípido A del LPS, presente en *Acinetobacter* spp. como patógeno Gram-negativo. Por lo tanto, es razonable pensar que se ha producido la activación de esta vía. En los resultados, el *TLR4* aparece sobreexpresado, pero no de una manera estadísticamente significativa, lo que puede estar debido a varios factores. En primer lugar, podría ser que, en el tiempo al que se realizó la extracción del ARN (2 h de infección) esta sobreexpresión significativa del receptor *TLR4* ya se hubiera producido y a las 2 h se mantuviera relativamente estable dedicando toda la maquinaria celular a la producción de las proteínas

proinflamatorias. Por otro lado, puede ser también que el receptor active las vías celulares que hay por debajo de él sin necesidad de aumentar significativamente su expresión en la superficie celular.

Otra incógnita que se plantea es la discrepancia sobre la expresión del gen de la quimiocina CXCL8 que se induce a las 2 h de infección en el presente trabajo, cosa que no ocurre en los experimentos llevados a cabo por Ubagai y cols., 2015 donde el LPS de *A. baumannii* no estimula la producción de esta quimiocina. Esta diferencia se debe probablemente al hecho de que en la presente tesis se produce una estimulación del neutrófilo con la bacteria entera, no solo con su LPS, de modo que al presentar la bacteria entera otros PAMPs, la estimulación del neutrófilo puede verse incrementada.

En resumen, cabe señalar que aunque esta activación de la respuesta proinflamatoria pueda parecer *a priori* beneficiosa en la lucha del hospedador contra el patógeno, la no resolución de estas señales puede resultar en una activación exagerada de la respuesta inmunitaria innata, causando serios problemas en el hospedador, como ya ha sido descrito con anterioridad (Nowak y Paluchowska, 2016). Esto favorecería la aparición de cuadros clínicos tan graves como la sepsis, relacionada también con la producción de NETs por los neutrófilos (Camicia y cols., 2014).

3.2. Macrófagos

Los resultados de los estudios realizados en esta tesis doctoral utilizando macrófagos sugieren una activación morfológica en el caso de la línea de macrófagos de ratón J774A.1, manifestada por una elongación de las células comprobada por microscopía confocal con una tinción de la actina. Sin embargo, no se pudo observar la presencia de bacterias en el interior de las células, indicando que la fagocitosis por parte de estos macrófagos no fue muy efectiva. Esto mismo pudo ser comprobado por microscopía de célula viva.

Teniendo en cuenta el contexto de una infección real, en que los neutrófilos "envían" señales para atraer y reclutar macrófagos al sitio de infección, se realizaron también experimentos de co-cultivo con macrófagos humanos y neutrófilos. En este caso, se pudo observar también una importante fagocitosis por parte de los neutrófilos pero no de los macrófagos. Estos resultados evidencian de nuevo la importancia de los neutrófilos a la hora de la fagocitosis de *A. baumannii* y *A. pittii*, más relevante que la que lleva a cabo la que ha sido tradicionalmente considerada como la célula fagocítica por excelencia, el macrófago.

Finalmente, es importante señalar también que el hecho de que los macrófagos no sean capaces de fagocitar a las bacterias, probablemente, pueda ser debido a que *Acinetobacter* utilice alguna herramienta para evadir este mecanismo de eliminación. Por ello, sería importante dilucidar el mecanismo molecular utilizado para este fin. Por otro lado, es factible considerar que, a diferencia de los neutrófilos, quizás los macrófagos necesiten una presentación de las bacterias opsonizadas para que se produzca la fagocitosis *in vitro*.

4. Limitaciones del estudio y perspectivas futuras

En lo que respecta a la elección de la línea celular epitelial A549, una limitación de este estudio podría ser la utilización de un solo tipo celular para probar la adherencia, internalización y citotoxicidad de *Acinetobacter* a dichas células. Sin embargo, aunque no aparezcan reflejados en el trabajo, se han llevado a cabo estudios preliminares con otras líneas celulares, como las células Vero, obteniéndose resultados similares a los presentados en el caso de la línea epitelial pulmonar A549.

Además, teniendo en cuenta el papel de las células epiteliales como primera línea de defensa del organismo, se podría haber profundizado en la respuesta de esta línea epitelial a *Acinetobacter*, comprobando la expresión génica de citocinas o midiendo el aumento de la concentración de las mismas en el sobrenadante de los cultivos infectados en comparación con los controles sin infectar.

Por otro lado, el número de cepas utilizado podría parecer limitado para poder obtener conclusiones generales sobre estas dos especies bacterianas. Sin embargo, esto se debe al hecho de que, tal y como se ha mostrado a lo largo de esta tesis doctoral, se realizaron un gran número de diferentes experimentos que no permitían técnicamente el aumento del número de cepas.

Respecto a los experimentos de interacción con células del sistema inmunitario, particularmente con los neutrófilos, una de las principales dificultades fue la dependencia de donantes de sangre para el aislamiento de los neutrófilos. Además, el kit de aislamiento utilizado, que proporcionaba una gran pureza en la extracción, resultó ser menos rentable económicamente que otros métodos utilizados comúnmente, por lo que cada experimento debía ser planificado de una manera muy precisa para evitar posibles errores.

El estudio de las NETs fue un punto especialmente crítico. Al no existir consenso en las técnicas a utilizar para la medida de estas estructuras, se decidieron llevar a cabo varios de estos métodos, tal y como se ha explicado, cada uno con su dificultad técnica. La puesta a punto de todas estas técnicas resultó especialmente complicada y hubo que adaptar los protocolos llevados a cabo anteriormente. La existencia de estas dificultades, justifica también que los experimentos cuantitativos pudieran llevarse a cabo en un número limitado de cepas.

Uno de los puntos que no quedan totalmente cerrados en este trabajo es la aparición de prolongaciones citoplasmáticas en la superficie de los neutrófilos, comprobadas por microscopía de fluorescencia y videomicroscopía. El mecanismo molecular por el que se forman y la función de estas estructuras están aún por dilucidar.

En cuanto a la expresión génica, se realizaron experimentos comparando la infección de los neutrófilos con la cepa de referencia de *A. baumannii* durante 2 h frente al control de neutrófilos sin estimular. Además, cabe indicar que esta expresión se pretendió estudiar, también, tras 4 h de infección. Sin embargo, uno de los principales problemas que se tuvieron durante este estudio fue la extracción de ARN de los neutrófilos y, en el caso de las infecciones a un tiempo de 4 h, no se consiguió obtener concentraciones y calidades aceptables del ARN para llevar a cabo las técnicas consecuentes de q-PCR. Esto puede estar debido a que a en ese tiempo de infección, como se ha comprobado por la microscopía, los neutrófilos están demasiado "cargados" de bacterias y comienzan a liberar su material intracelular al medio. Por ello, sería interesante cuantificar por medio de ELISA las proteínas existentes en el sobrenadante de los cultivos de neutrófilos infectados a estos tiempos. En este aspecto, también sería interesante poder aumentar el número de cepas para comparar la expresión génica de los neutrófilos infectados por cada una de ellas.

Por otro lado, para comprobar la contribución del LPS a la respuesta inmunitaria, se ha conseguido, gracias a una colaboración, una cepa de *A. baumannii* mutante en el lípido A del LPS que se utilizará para determinar la diferencia de expresión génica entre la cepa silvestre, que ya se ha estudiado, y el mutante.

Por último, comentar que esta tesis doctoral se ha centrado, principalmente, en un estudio exhaustivo y completo de la infección de *A. baumannii* y *A. pittii* en células cultivadas por separado. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en un contexto real, cuando tiene lugar una infección, la bacteria interacciona con un conjunto de células que se comunican entre ellas mediante la expresión y liberación al medio de citocinas, dando lugar a una respuesta conjunta, dirigida y sincronizada. Es por esto que se considera relevante poder llevar a cabo, en un futuro, un modelo de co-cultivo que implique a distintos tipos celulares que forman parte de la respuesta. Alguno de ellos, como el co-cultivo de neutrófilos y macrófagos, ya se ha presentado en esta tesis doctoral.

CONCLUSIONES

Primera. En las condiciones ensayadas, las cepas de *Acinetobacter baumannii* y *A. pittii* no presentan adherencia, internalización ni citotoxicidad hacia las células epiteliales pulmonares humanas de la línea celular A549 (ATCC[®] CCL185[™]).

Segunda. Las cepas de *Acinetobacter* spp. utilizadas en el presente estudio, son fagocitadas por neutrófilos humanos y las bacterias mueren en el interior de estas células.

Tercera. En proporción variable y dependiendo de las cepas bacterianas, los neutrófilos producen NETs en respuesta a la infección por *Acinetobacter*.

Cuarta. Los análisis de expresión génica en neutrófilos infectados revelan una respuesta principalmente proinflamatoria a la infección por *Acinetobacter*.

Quinta. Los macrófagos humanos y de ratón testados muestran una baja actividad fagocítica frente a las distintas cepas de *A. baumannii* y *A. pittii*.

REFERENCIAS

Abbas S., Ahmed I., Kudo T., Iida T., Ali G. M., Fujiwara T., Ohkuma M. 2014. Heavy metaltolerant and psychrotolerant bacterium *Acinetobacter pakistanensis* sp. nov. isolated from a textile dyeing waste water treatment pond. Pak. J. Agric. Sci. 51:593-608.

Al Atrouni A., Joly-Guillou M. L., Hamze M., Kempf M. 2016. Reservoirs of Non-*baumannii Acinetobacter* Species. Front. Microbiol. 7:49.

Almasaudi S. B. 2018. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi J. Biol. Sci. 25:586-596.

Álvarez-Pérez S., Lievens B., Jacquemyn H., Herrera C. M. 2013. *Acinetobacter nectaris* sp. nov. and *Acinetobacter boissieri* sp. nov., isolated from floral nectar of wild Mediterranean insect-pollinated plants. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:1532-1539.

Ambler R.P. 1980. The structure of β -lactamases. Philos Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 289: 321-331.

Amulic B., Cazalet C., Hayes G. L., Metzler K. D., Zychlinsky A. 2012. Neutrophil function: from mechanisms to disease. Annu. Rev. Immunol. 30:459-489.

Anandham R., Weon H. Y., Kim S. J., Kim Y. S., Kim B. Y., Kwon S. W. 2010. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. J. Microbiol. 48:36-39.

Auron. 1998. The Interleukin 1 Receptor: Ligand Interactions and Signal Transduction. Cytokine Growth Factor Rev. 9: 221-237.

Ayats J., Corbella X., Ardanuy C., Domínguez M. A., Ricart A., Ariza J., Martin R., Liñares J. 1997. Epidemiological significance of cutaneous, pharyngeal, and digestive tract colonization by multiresistant *Acinetobacter baumannii* in ICU patients. J. Hosp. Infect. 37:287-295.

Beijerinck, M. 1911. Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. Versl. Koninklijke Akad. Wetensch. Amsterdam. 19:1092-1103.

Bennouna S., Bliss S. K., Curiel T. J., Denkers E. Y. 2003. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. J. Immunol. 171:6052-6058.

Bentancor L. V., Routray A., Bozkurt-Guzel C., Camacho-Peiro A., Pier G. B., Maira-Litran T. 2012. Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections. Infect. Immun. 80:3381-3388.

Bhuiyan M. S., Ellett F., Murray G. L., Kostoulias X., Cerqueira G. M., Schulze K. E., Mahamad Maifiah M. H., Li J., Creek D. J., Lieschke G. J., Peleg A. Y. 2016. *Acinetobacter baumannii* phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 113:9599-9604.

Bou G., Martinez-Beltran J. 2000. Cloning, nucleotide sequencing and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 44:428-432.

Boujaafar N., Freney J., Bouvet P. J., Jeddi M. 1990. Cell surface hydrophobicity of 88 clinical strains of *Acinetobacter baumannii*. Res. Microbiol. 141:477-482.

Bouvet P.J.M. y Grimont P.A.D. 1986. Taxonomy of the Genus Acinetobacter with the recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., Acinetobacter junii sp. nov and Emended descriptions of Acinetobacter calcoaceticus. Int. J. Syst. Bacteriol. Society for general Microbiology. 36:228-240.

Bravo Z, Chapartegui-González I, Lázaro-Díez M, Ramos-Vivas J. 2018. *Acinetobacter pittii* biofilm formation on inanimate surfaces after long-term desiccation. J. Hosp. Infect. 98:74-82.

Bravo Z., Orruño M., Parada C., Kaberdin V. R., Barcina I., Arana I. 2016. The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606(T) under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. Arch. Microbiol. 198:399-407.

Breslow J. M., Meissler J. J. Jr, Hartzell R. R., Spence P. B., Truant A., Gaughan J., Eisenstein T. K. 2011. Innate immune responses to systemic *Acinetobacter baumannii* infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. Infect. Immun. 79:3317-3327.

Brinkmann V., Goosmann C., Kühn L. I., Zychlinsky A. 2013. Automatic quantification of in vitro NET formation. Front. Immunol. 3:413.

Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 303:1532-1535.

Brinkmann V., Zychlinsky A. J. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? Cell Biol. 198:773-783.

Brisou, J. y Prevot A. R. 1954. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group. Ann. Inst. Pasteur (Paris). 86:722-728.

Cai Y., Chai D., Wang R., Liang B., Bai N. 2012. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. J. Antimicrob. Chemother. 67:1607-1615.

Camicia G., Pozner R., de Larrañaga G. 2014. Neutrophil extracellular traps in sepsis. Shock. 42:286-294.

Carbonne A., Naas T., Blanckaert K., Couzigou C., Cattoen C., Chagnon J. L., Nordmann P, Astagneau P. 2005. Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum betalactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. J. Hosp. Infect. 60:14-18.

Carr E. L., Kämpfer P., Patel B. K, Gürtler V., Seviour R. J. 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:953-963.

Carruthers M. D., Nicholson P. A., Tracy E. N., Munson R. S. 2013. *Acinetobacter baumannii* utilizes a type VI secretion system for bacterial competition. PLoS ONE.

Celenza G., Pellegrini C., Caccamo M., Segatore B., Amicosante G., Perilli M. 2006. Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. J. Antimicrob.1 Chemother. 57:975-978.

Chao C. T., Lee S. Y., Yang W. S., Chen H. W., Fang C. C., Yen C. J., Chiang C. K., Hung K. Y., Huang J.W. 2014. *Acinetobacter* peritoneal dialysis peritonitis: a changing landscape over time. PLoS One. 9:e110315.

Chapartegui-González I., Lázaro-Díez M., Bravo Z., Navas J., Icardo J. M., Ramos-Vivas J. 2018. Acinetobacter baumannii maintains its virulence after long-time starvation. PLoS One. 13:e0201961.

Choi J. Y., Ko G., Jheong W., Huys G., Seifert H., Dijkshoorn L., Ko K. S. 2013. *Acinetobacter kookii* sp. nov., isolated from soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:4402-4406.

Choi C. H., Lee E. Y., Lee Y. C., Park T. I., Kim H. J., Hyun S. H., Kim S. A., Lee S. K., Lee J.C. 2005. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. Cell Microbiol. 7:1127-1238.

Choi C. H., Lee J. S., Lee Y. C., Park TI, Lee JC. 2008. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. BMC Microbiol. 8:216.

Choi E. Y., Santoso S., Chavakis T. 2009. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. Front. Biosci. 14:1596-1605.

Chu Y. W., Afzal-Shah M., Houang E. T., Palepou M. I., D. J. Lyon D. J., Woodford N., Livermore D. M. 2001. IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob. Agents Chemother. 45:710-714.

Chuah C., Jones M. K., Burke M. L., McManus D. P., Owen H. C., Gobert G. N. 2014. Defining a pro-inflammatory neutrophil phenotype in response to schistosome eggs. Cell Microbiol. 16:1666-1677.

Cisneros J. M., Rodríguez-Baño J. 2002. Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii: epidemiology, clinical features and treatment. Clin. Microbiol. Infect. 8:687-693.

Cornaglia G., Riccio M. L., Mazzariol A., Lauretti L., Fontana R., Rossolini G. M. 1999. Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe. Lancet 353:899-900.

Corvec S., Caroff N., Espaze E., Giraudeau C., Drugeon H., Reynaud A. 2003. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. J. Antimicrob. Chemother. 52:629-635.

Cosgaya C., Marí-Almirall M., Van Assche A., Fernández-Orth D., Mosqueda N., Telli M., Huys G., Higgins P. G., Seifert H., Lievens B., Roca I, Vila J. 2016. *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66:4105-4111.

Costantini C., Cassatella MA. 2011. The defensive alliance between neutrophils and NK cells as a novel arm of innate immunity. J. Leukoc. Biol. 89:221-233.

Costerton, J.W., Steward, P.W., Greenberg, E.P. 1999. Bacterial Biolfilms: a common cause of persistence infections. Science. 284:1318-1322.

Da Silva G. J., Correia M., Vital C., Ribeiro G., Sousa J. C., Leitao R., Peixe L., Duarte A. 2002. Molecular characterization of bla (IMP-5), a new integron-borne metallo-betalactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. FEMS Microbiol. Lett. 215:33-39.

Da Silva G.J., Domingues S. 2016. Insights on the Horizontal Gene Transfer of Carbapenemase determinants in the Opportunistic Pathogen *Acinetobacter baumannii*. Microorganisms. 4. pii: E29.

Davis K. A., Moran K. A., McAllister C. K., Gray P. J. 2005. Multidrug-resistant *Acinetobacter* extremity infections in soldiers. Emerg. Infect. Dis. 11:1218-1224.

Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M. A., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M. 2017. Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. Front. Immunol. 8:81.

Di Cello F, Pepi M, Baldi F, Fani R. 1997. Molecular characterization of an n-alkanedegrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. Res. Microbiol. 148:237-249. Dijkshoorn L., van Harsselaar B., Tjernberg I., Bouvet P.J.M., Vaneechoutte, M. 1998. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. Syst. and Appl. Microbiol. 21:33-39.

Dou Y., Song F., Guo F., Zhou Z., Zhu C., Xiang J., Huan J. 2017. *Acinetobacter baumannii* quorum-sensing signalling molecule induces the expression of drug-resistance genes. Mol. Med. Rep. 15:4061-4068.

Ecker J. A., Massire C., Hall T. A., Ranken R., Pennella T. T., Agasino-Ivy C., Blyn L. B., Hofstadler S. A., Endy T. P., Scott P. T., Lindler L., Hamilton T., Gaddy C., Snow K., Pe M., Fishbain J., Craft D., Deye G., Riddell S., Milstrey E., Petruccelli B., Brisse S., Harpin V., Schink A., Ecker D. J., Sampath R., Eshoo M. W. 2006. Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 44:2921-2932.

Endimiani A., Luzzaro F., Migliavacca R., Mantengoli E., Hujer A. M., Hujer K. M., Pagani L., Bonomo R. A., Rossolini G. M., Toniolo A. 2007. Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 51:2211-2214.

Erlich P. 1880. Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. Zeitschrift fuer klinische Medizin 1:553-560.

Eugenin E. A. 2013. Community-acquired pneumonia infections by *Acinetobacter baumannii:* how does alcohol impact the antimicrobial functions of macrophages? Virulence. 4:435-436.

Eveillard M., Kempf M., Belmonte O., Pailhoriès H., Joly-Guillou M. L. 2013. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. Int. J. Infect. Dis. 17:e802-85.

Falagas M. E., Karveli E. A. , Kelesidis I., Kelesidis T. 2007. Community-acquired *Acinetobacter* infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 26:857-868.

Feng G. D., Yang S. Z., Wang Y. H., Deng M. R., Zhu H. H. 2014. *Acinetobacter guangdongensis* sp. nov., isolated from abandoned lead-zinc ore. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:3417-3421.

Fox S., Leitch A. E., Duffin R., Haslett C., Rossi A. G. 2010. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. J. Innate Immun. 2:216-227.

Fuchs T. A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. J. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. Cell Biol. 176:231-241.

Fyhrquist N., Ruokolainen L., Suomalainen A., Lehtimäki S., Veckman V., Vendelin J., Karisola P., Lehto M., Savinko T., Jarva H., Kosunen T. U, Corander J., Auvinen P., Paulin L., von Hertzen L., Laatikainen T., Mäkelä M., Haahtela T., Greco D., Hanski I., Alenius H. 2014. *Acinetobacter* species in the skin microbiota protect against allergic sensitization and inflammation. J. Allergy Clin. Immunol. 134:1301-1309.

Gaddy J. A., Actis L. A. 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. Future Microbiol. 4:273-278.

Gaddy J. A., Arivett B. A., McConnell M. J-, López-Rojas R., Pachón J., Actis L. A. 2012. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. Infect. Immun. 80:1015-1024. Gaddy J. A., Tomaras A. P., Actis L. A. 2009. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect. Immun. 77:3150-3160.

García-Patiño M. G., García-Contreras R., Licona-Limón P. 2017. The immune response against *Acinetobacter baumannii*, an emerging pathogen in nosocomial Infections. Front. Immunol. 8:441.

Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J., Arnstein P., Kersey J. H., Dosik H., Parks W. P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J. Natl. Cancer Inst. 51:1417-1423.

Gómez M. I., Prince A. 2008. Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. Pediatr. Pulmonol. 43:11-19.

Grguric-Smith L. M., Lee H. H., Gandhi J.A., Brennan M. B., DeLeon-Rodriguez C. M., Coelho C., Han G., Martinez L. R. 2015. Neutropenia exacerbates infection by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in a murine wound model. Front. Microbiol. 6:1134.

Guardabassi L., Dijkshoorn L., Collard J. M., Olsen J. E., Dalsgaard A. 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. J. Med. Microbiol. 49:929-936.

Gundi V. A., Dijkshoorn L., Burignat S., Raoult D., La Scola B. 2009. Validation of partial rpoB gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. Microbiology. 155:2333-2341.

Hamouda A., Amyes S. G. 2004. Novel gyrA and parC point mutations in two strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to ciprofloxacin. J. Antimicrob. Chemother. 54:695-696.

Higgins P. G., Lehmann M., Hilmar Wisplinghoff H., Seifert H. 2010. gyrB Multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species. J. Clin. Microbiol. 48:4592-4594.

Huang C., Long Q., Qian K., Fu T., Zhang Z., Liao P., Xie J.2015. Resistance and integron characterization of *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Chongqing, China. New Microbes New Infect. 8:103-108.

Imperi F., Antunes L. C., Blom J., Villa L., Iacono M., Visca P., Carattoli A. 2011. The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. IUBMB Life. 63:1068-1074.

Irie Y., Parsek M. R. 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 322:67-84.

Jacobs A. C., Hood I., Boyd K. L., Olson P. D., Morrison J. M., Carson S., Sayood K., Iwen P. C., Skaar E. P., Dunman P. M. 2010. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. Infect. Immun. 78:1952-1962.

Janssen P., Maquelin K., Coopman R., Tjernberg I., Bouvet P., Kersters K., Dijkshoorn L. 1997. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:1179-1187.

Jawad A., Hawkey P. M., Heritage J., Snelling A. M. 1994. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. J. Clin. Microbiol. 32:2353-2358.

Jiménez-Guerra G., Heras-Cañas V., Gutiérrez-Soto M., Del Pilar Aznarte-Padial M., Expósito-Ruiz M., Navarro-Marí J.M., Gutiérrez-Fernández J. 2018. Urinary tract infection

by Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa: evolution of antimicrobial resistance and therapeutic alternatives. J. Med. Microbiol. 67:790-797.

Johnson T. L., Waack U., Smith S., Mobley H., Sandkvist M. 2015. *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type II secretion system and its substrate LipA for lipid utilization and in vivo fitness. J. Bacteriol. 198:711-719.

Jung J., Park W. 2015. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99:2533-2548.

Kamoshida G., Kikuchi-Ueda T., Nishida S., Tansho-Nagakawa S., Ubagai T., Ono Y. 2018. Pathogenic bacterium *Acinetobacter baumannii* inhibits the formation of Neutrophil Extracellular Traps by suppressing neutrophil adhesion. Front. Immunol. 9:178.

Kamoshida G., Kikuchi-Ueda T., Tansho-Nagakawa S., Nakano R., Nakano A., Kikuchi H., Ubagai T., Ono Y. 2015. *Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs). J. Infect. Chemother. 21:43-49.

Kamoshida G., Tansho-Nagakawa S., Kikuchi-Ueda T., Nakano R., Hikosaka K., Nishida S., Ubagai T., Higashi S., Ono Y. 2016. A novel bacterial transport mechanism of *Acinetobacter baumannii* via activated human neutrophils through interleukin-8. J. Leukoc. Biol. 100:1405-1412.

Kim D., Baik K. S., Kim M. S., Park S. C., Kim S. S., Rhee M. S., Kwak Y. S., Seong C. N. 2008. *Acinetobacter soli* sp. nov., isolated from forest soil. J. Microbiol. 46:396-401.

Kim J. S., Kim J. M., Jung H. C., Song I. S. 2001. Expression of cyclooxygenase-2 in human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* water-soluble proteins: possible involvement of NF-kappaB and MAP kinase signaling pathway. Dig. Dis. Sci. 46:2277-2284.

Kim B. N., Peleg A. Y., Lodise T. P., Lipman J., Li J., Nation R., Paterson D. L. 2009. Management of meningitis due to antibiotic-resistant *Acinetobacter* species. L. Lancet Infect. Dis. 9:245-255.

Kim P. S., Shin N. R., Kim J. Y., Yun J. H., Hyun D. W., Bae J.W. 2014. *Acinetobacter apis* sp. nov., isolated from the intestinal tract of a honey bee, *Apis mellifera*. J. Microbiol. 52:639-645.

Kimura T., Iwase M., Kondo G., Watanabe H., Ohashi M., Ito D., Nagumo M. 2003. Suppressive effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokine release in human neutrophils. Int. Immunopharmacol. 3:1519-1528.

Kwon S. O., Gho Y. S., Lee J. C., Kim S. I. 2009. Proteome analysis of outer membrane vesicles from a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate. FEMS Microbiol. Lett. 297:150-156.

Konstantinidis T., Kambas K., Mitsios A., Panopoulou M., Tsironidou V., Dellaporta E., Kouklakis G., Arampatzioglou A., Angelidou I., Mitroulis I., Skendros P., Ritis K. 2015. Immunomodulatory Role of Clarithromycin in Acinetobacter baumannii Infection via Formation of Neutrophil Extracellular Traps. Antimicrob. Agents Chemother. 60:1040-1048.

Koyama Y, Kurosasa A, Tsuchiya A, Takakuta K. 1950. A new antibiotic "colistin" produced by spore-forming soil bacteria. J. Antibiot. 3:457-458.

Krasowska A., Sigler K. 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? Front. Cell Infect. Microbiol. 4:112.

Kress H., Stelzer E. H., Holzer D., Buss F., Griffiths G., Rohrbach A. 2007. Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 104:11633-11638.

Krizova L., McGinnis J., Maixnerova M., Nemec M., Poirel L., Mingle L., Sedo O., Wolfgang W., Nemec A. 2015. *Acinetobacter variabilis* sp. nov. (formerly DNA group 15 sensu Tjernberg & Ursing), isolated from humans and animals. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65:857-63. Errata en: Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65:1395.

Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Nemec A. 2014. *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. Syst. Appl. Microbiol. 37:467-473.

Krizova L., Maixnerova M., Sedo O., Nemec A. 2015. *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65:3905-3912.

La Scola B., Gundi V. A., Khamis A., Raoult D. 2006. Sequencing of the rpoB gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. J. Clin. Microbiol. 44:827-832.

Lacy P. 2006. Mechanisms of Degranulation in Neutrophils. Allergy Asthma Clin. Immunol. 2:98-108.

Lacroix M. 2008. Persistent use of "false" cell lines. Int. J. Cancer. 122:1-4.

Laganà P., Melcarne L., Delia S. 2015. *Acinetobacter baumannii* and endocarditis, rare complication but important clinical relevance. Int. J. Cardiol. 187:678-679.

Lee W. L., Harrison R. E., Grinstein S. 2003. Phagocytosis by neutrophils. Microbes Infect. 5:1299-1306.

Lee J. C., Koerten H., van den Broek P., Beekhuizen H., Wolterbeek R., van den Barselaar M., van der Reijden T., van der Meer J., van de Gevel J., Dijkshoorn L. 2006. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. Res. Microbiol. 157:360-366.

Lee H. W., Koh Y. M., Kim J., Lee J. C., Lee Y. C., Seol S. Y., Cho D. T., Kim J. 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clin. Microbiol. Infect. 14:49-54.

Lee K., Lee W. G., Uh Y., Ha G. Y., Cho J., Chong Y. 2003. VIM- and IMP-type metallobeta-lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. Emerg. Infect. Dis. 9:868-871.

Lee K., Yong D., Jeong S. H., Chong Y. 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter* spp.: increasingly problematic nosocomial pathogens. Yonsei Med. J. 52:879-891.

Lee H., Yong D., Yum J. H., Roh K. H., Lee K., Yamane K., Arakawa Y., Chong Y. 2006. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 56:305-312.

Leliefeld P. H., Koenderman L., Pillay J. 2015. How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. Front. Immunol. 6:471.

Lessel E.F. 1971. Subcommitte on nomenclature of *Moraxella* and allied bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 21:213-214.

Ley K. 2002. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils. Immunol. Rev. 186:8-18.

Li X., Tang Y., Lu X. 2018. Insight into identification of *Acinetobacter* species by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in the clinical laboratory. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 29:1546-1553.

Li Y., Chang J., Guo L. M., Wang H. M., Xie S. J., Piao C. G., He W. 2015. Description of *Acinetobacter populi* sp. nov. isolated from symptomatic bark of Populus x euramericana canker. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65:4461-4468.

Li Y., He W., Wang T, Piao C. G., Guo L. M., Chang J. P., Guo M. W., Xie S. J. 2014. *Acinetobacter qingfengensis* sp. nov., isolated from canker bark of Populus xeuramericana. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:1043-1050.

Li Y., Piao C. G., Ma Y. C., He W., Wang H. M., Chang J. P., Guo L. M., Wang X. Z., Xie S. J., Guo M. W. 2013. *Acinetobacter puyangensis* sp. nov., isolated from the healthy and diseased part of Populus x euramericana canker bark. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63:2963-2969.

Li Z. T., Zhang R. L., Bi X. G., Xu L., Fan M., Xie D., Xian Y., Wang Y., Li X. J., Wu Z. D., Zhang K. X. 2015. Outer membrane vesicles isolated from two clinical *Acinetobacter baumannii* strains exhibit different toxicity and proteome characteristics. Microb. Pathog. 81:46-52.

Li W., Zhang D., Huang X., Qin W. 2014. *Acinetobacter harbinensis* sp. nov., isolated from river water. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:1507-1513.

López-Castejón G, Brough D. 2011. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. Cytokine Growth Factor Rev. 22:189-195.

Luke N. R., Sauberan S. L., Russo T. A., Beanan J. M., Olson R., Loehfelm T. W., Cox A. D., St Michael F., Vinogradov E. V., Campagnari A. A. 2010. Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. Infect. Immun. 78:2017-2023.

Luna C. M, Aruj P. K. 2007. Nosocomial *Acinetobacter* pneumonia. Respirology. 12:787-791.

Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18:268-281.

Malhotra J., Anand S., Jindal S., Rajagopal R., Lal R. 2012. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62:2883-2890.

Mantovani A., Cassatella M. A., Costantini C., Jaillon S. 2011. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. Nat. Rev. Immunol. 11:519-531.

Marcovich A., Levartovsky S. 1994. *Acinetobacter* exposure keratitis. Br. J. Ophthalmol. 78:489-490.

Masuda S., Shimizu S., Matsuo J., Nishibata Y., Kusunoki Y., Hattanda F., Shida H., Nakazawa D., Tomaru U., Atsumi T., Ishizu A. 2017. Measurement of NET formation in vitro and in vivo by flow cytometry. Cytometry A. 91:822-829.

McConnell M. J. Pérez-Romero P., Lepe J. A., Pérez-Ordóñez A., Valencia R., Vázquez-Barba I., Pachón J. 2011. Positive predictive value of Leeds *Acinetobacter* medium for environmental surveillance of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 49:4416.

Menegazzi R., Decleva E., Dri P. 2012. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? Blood. 119:1214-1216.

Mestas J., Hughes C. C. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. J. Immunol. 172:2731-2718.

Metchnikoff I. 1893. Lecon sur le pathologie comparee de inflammation. Ann. Inst. Pasteur. 7:348.

Metzler K. D., Fuchs T. A., Nauseef W. M., Reumaux D., Roesler J., Schulze I., Wahn V., Papayannopoulos V., Zychlinsky A. 2011. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. Blood. 117:953-959.

Mostachio A. K., Levin A. S., Rizek C., Rossi F., Zerbini J., Costa S. F. 2012. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. Int. J. Antimicrob Agents. 39:396-401.

Naas T., Bogaerts P., Bauraing C., Degheldre Y., Glupczynski Y., Nordmann P. 2006. Emergence of PER and VEB extended-spectrum betalactamases in *Acinetobacter baumannii* in Belgium. J. Antimicrob. Chemother. 58:178-182.

Naccache P.H., Fernandes M.J. Eur J Immunol. 2016. Challenges in the characterization of neutrophil extracellular traps: The truth is in the details. Eur. J. Immunol. 46:52-55.

Naiemi N. A., Duim B., Savelkoul P. H., Spanjaard L., de Jonge E., Bart A., Vandenbroucke-Grauls C. M., de Jong M. D. 2005. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species in an intensive care unit: implications for hospital epidemiology. J. Clin. Microbiol. 43:4862-4864.

Nemec A., De Baere T., Tjernberg I., Vaneechoutte M., van der Reijden T. J., Dijkshoorn L. 2001. *Acinetobacter ursingii* sp. nov. and *Acinetobacter schindleri* sp. nov., isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1891-1899.

Nemec A., Dijkshoorn L., Cleenwerck I., De Baere T., Janssens D., Van Der Reijden T. J., Jezek P., Vaneechoutte M. 2003. *Acinetobacter parvus* sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53:1563-1567.

Nemec A., Dolzani L., Brisse S., van den Broek P., Dijkshoorn L. 2004. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. J. Med. Microbiol. 53:1233-1240.

Nemec A., Krizova L., Maixnerova M., Sedo O., Brisse S., Higgins P. G. 2015. *Acinetobacter* seifertii sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65:934-942.

Nemec A., Krizova L., Maixnerova M., van der Reijden T.J., Deschaght P., Passet V., Vaneechoutte M., Brisse S., Dijkshoorn L. 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex* with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). Res. Microbiol. 162:393-404.

Nemec A., Musílek M., Maixnerová M., De Baere T., van der Reijden T. J., Vaneechoutte M., Dijkshoorn L. 2009. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:118-124.

Nemec A., Musílek M., Sedo O., De Baere T., Maixnerová M., van der Reijden T. J., Zdráhal Z., Vaneechoutte M., Dijkshoorn L. 2010. *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60:896-903.

Nemec A., Radolfova-Krizova L., Maixnerova M., Vrestiakova E., Jezek P., Sedo O. 2016. Taxonomy of haemolytic and/or proteolytic strains of the genus *Acinetobacter* with the proposal of *Acinetobacter courvalinii* sp. nov. (genomic species 14 sensu Bouvet & Jeanjean), *Acinetobacter dispersus* sp. nov. (genomic species 17), *Acinetobacter modestus* sp. nov., *Acinetobacter proteolyticus* sp. nov. and *Acinetobacter vivianii* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66:1673-1685.

Nigro S. J. y Hall R. M. 2016. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the *oxa23* carbapenemase gene. J. Antimicrob. Chemother. 71:1135-1147.

Nishimura Y., Takeshi I., Hiroshi I.1988. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 38:209-211.

Nowak P, Paluchowska P. 2016. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. Folia Histochem. Cytobiol. 54:61-74.

Nowak J., Zander E., Stefanik D., Higgins P. G., Roca I., Vila J., McConnell M. J., Cisneros J. M., Seifert H. MagicBullet Working Group WP4. 2017. High incidence of pandrugresistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. J. Antimicrob. Chemother. 72:3277-3282.

Ong C. W., Lye D. C., Khoo K. L., Chua G. S., Yeoh S. F., Leo Y. S., Tambyah P.A, Chua A. C. 2009. Severe community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia: an emerging highly lethal infectious disease in the Asia-Pacific. Respirology. 14:1200-1205.

Pagano M., Martins A. F., Barth A. L. 2016. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Braz. J. Microbiol. 47:785-792.

Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. J. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. 2010. Cell Biol. 191:677-691.

Park J. S., Arcaroli J., Yum H. K., Yang H., Wang H., Yang K. Y., Choe K. H., Strassheim D., Pitts T. M., Tracey K. J., Abraham E. 2003. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 284:870-879.

Paton R., Miles R. S., Hood J., Amyes S. G. B. 1993. ARI-1: lactamase- mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents 2:81-88.

Peleg A. Y., Jara S., Monga D., Eliopoulos G. M., Moellering R. C. Jr, Mylonakis E. 2009. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. Antimicrob. Agents Chemother. 53:2605-2609.

Peleg A. Y., Seifert H., Paterson D. L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21:538-582.

Philpott D. J., Girardin S. E., Sansonetti P. J. 2001. Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. Curr. Opin. Immunol. 13:410-416.

Poppel M. T., Skiebe E., Laue M., Bergmann H., Ebersberger I., Garn T., Fruth A., Baumgardt S., Busse H.J., Wilharm G. 2016. *Acinetobacter equi* sp. nov., isolated from horse faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66:881-888.

Prince L. R., Whyte M. K., Sabroe I., Parker L. C. 2011. The role of TLRs in neutrophil activation. Curr. Opin. Pharmacol. 11:397-403.

Quinn M. T., Ammons M. C., Deleo F. R. 2006. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. Clin. Sci. (Lond). 111:1-20.

Qureshi Z. A., Hittle L. E., O'Hara J. A., Rivera J. I., Syed A., Shields R. K., Pasculle A. W., Ernst R. K., Doi Y. 2015. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. Clin. Infect. Dis. 60:1295-12303.

Radolfova-Krizova L., Maixnerova M., Nemec A. 2016. *Acinetobacter pragensis* sp. nov., found in soil and water ecosystems. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66:3897-3903.

Radolfova-Krizova L., Maixnerova M., Nemec A. 2016. *Acinetobacter celticus* sp. nov., a psychrotolerant species widespread in natural soil and water ecosystems. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66:5392-5398.

Ribera A., Roca I., Ruiz J., Gibert I, Vila J. 2003. Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 52:477-480.

Rigby, K.M., DeLeo, F.R. 2012. Neutrophils in innate host defense against Staphylococcus aureus infections. Semin. Immunopathol. 34:237-259.

Rodríguez-Espinosa O., Rojas-Espinosa O., Moreno-Altamirano M. M., López-Villegas E. O., Sánchez-García F. J. 2015. Metabolic requirements for neutrophil extracellular traps formation. Immunology. 145:213-224.

Rooney AP, Dunlap CA, Flor-Weiler LB. 2016. *Acinetobacter lactucae* sp. nov., isolated from iceberg lettuce (*Asteraceae: Lactuca sativa*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66:3566-3572.

Rumbo C., Fernández-Moreira E., Merino M., Poza M., Mendez J. A., Soares N. C., Mosquera A., Chaves F., Bou G. 2011. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 55:3084-3090.

Russo T. A., Luke N. R., Beanan J. M., Olson R., Sauberan S. L., MacDonald U., Schultz LW, Umland T. C., Campagnari A. 2010. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. Infect. Immun. 78:3993-4000. 10.1128/IAI.00366-10.

Seifert H., Dijkshoorn L., Gerner-Smidt P., Pelzer N., Tjernberg I., Vaneechoutte M. 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J. Clin. Microbiol. 35:2819-2825.

Silva M. T., Correia-Neves M. 2012. Neutrophils and macrophages: the main partners of phagocyte cell systems. Front. Immunol. 3:174.

Smani Y., Docobo-Pérez F., McConnell M. J., Pachón J. 2011. *Acinetobacter baumannii*induced lung cell death: role of inflammation, oxidative stress and cytosolic calcium. Microb Pathog. 50:224-232.

Smani Y., McConnell M. J., Pachón J. 2012. Role of fibronectin in the adhesion of *Acinetobacter baumannii* to host cells. PLoS One. 7(4):e33073.

Smet A., Cools P., Krizova L., Maixnerova M., Sedo O., Haesebrouck F., Kempf M., Nemec A., Vaneechoutte M. 2014. *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64:4007-4015.

Subrahmanyam Y. V., Yamaga S., Prashar Y., Lee H. H., Hoe N. P., Kluger Y., Gerstein M., Goguen J. D., Newburger P. E., Weissman S. M. 2001. RNA expression patterns change dramatically in human neutrophils exposed to bacteria. Blood. 97:2457-2468.

Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D. L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M., Outterson K., Patel J., Cavaleri M.,

Cox E. M., Houchens C. R., Grayson M. L., Hansen P., Singh N., Theuretzbacher U., Magrini N.; WHO Pathogens Priority List Working Group. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect. Dis. 18:318-327.

Tak T., Tesselaar K., Pillay J., Borghans J. A., Koenderman L. 2013. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. J. Leukoc. Biol. 94:595-601.

Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sendo F. J. 1996. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. J. Leukoc. Biol. 59:229-240.

Tecchio C., Micheletti A., Cassatella M. A. 2014. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. Front Immunol. 5:508.

Teixeira A. B., Barin J., Hermes D. M., Barth A. L., Martins A. F. 2017. PCR Assay Based on the gyrB Gene for rapid identification of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex at specie level. J. Clin. Lab. Anal. 31:475.

Tjernberg I., Ursing J. 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. APMIS. 97:595-605.

Tomaras A. P., Dorsey C. W., Edelmann R. E., Actis L. A. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. Microbiology. 149:3473-3484.

Towner K. J. 2009. *Acinetobacter:* an old friend, but a new enemy. J. Hosp. Infect. 73:355-363.

Tsakris A., Ikonomidis A, Pournaras S., Tzouvelekis L. S., Sofianou D., Legakis N. J., Maniatis A. N. 2006. VIM-1 metallo-beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Emerg. Infect. Dis. 12:981-983

Turton J. F., Shah J., Ozongwu C., Pike R. 2010. Incidence of *Acinetobacter* species other than *A. baumannii* among clinical isolates of *Acinetobacter*: evidence for emerging species. J Clin Microbiol. 48:1445-1449.

Turton J. F., Woodford N, Judith Glover J, Susannah Yarde S., Mary E. Kaufmann M. E., Pitt T.L. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. J. Clin. Microbiol. 44:2974-2976.

Ubagai T., Nakano R., Nakano A., Kamoshida G., Ono Y. 2015. Gene expression analysis in human polymorphonuclear leukocytes stimulated by LPSs from nosocomial opportunistic pathogens. Innate Immun. 21:802-812.

Urban C. F., Lourido S., Zychlinsky A. 2006. How do microbes evade neutrophil killing? Cell Microbiol. 8:1687-1696.

Van Faassen H., KuoLee R., Harris G., Zhao X., Conlan J. W., Chen W. 2007. Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with *Acinetobacter baumannii* in mice. Infect Immun. 75:5597-5608.

Vashist J., Tiwari V., Das R., Kapil A., Rajeswari M.R. 2011. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. Indian J. Med. Res. 133:332-338.

Vaz-Moreira I., Novo A., Hantsis-Zacharov E., Lopes A. R., Gomila M., Nunes O. C., Manaia C. M., Halpern M. 2011. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:2837-2843.

Vols S., Sionov R. V., Granot Z. 2017. Always Look On the Bright Side: Anti-Tumor Functions of Neutrophils. Curr. Pharm. Des. 23:4862-4892.

White P. C., Chicca I. J., Ling M. R., Wright H. J., Cooper P. R., Milward M. R., Chapple I. L. 2017. Characterization, Quantification, and Visualization of Neutrophil Extracellular Traps. Methods Mol. Biol. 1537:481-497.

Wieczorek P., Sacha P., Hauschild T., Zórawski M., Krawczyk M., Tryniszewska E. 2008. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*--the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. Folia Histochem. Cytobiol. 46:257-267.

Wisplinghoff H. 2017. *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and miscellaneous Gram-Negative Bacilli. Infec. Dis. 4:1579-1599.

Yang H., Biermann M. H., Brauner J. M., Liu Y., Zhao Y., Herrmann M. 2016. New insights into Neutrophil Extracellular Traps: mechanisms of formation and role in inflammation. Front. Immunol. 7:302.

Yang C. W, Unanue E. R. 2013. Neutrophils control the magnitude and spread of the immune response in a thromboxane A2-mediated process. J Exp Med. 210:375-87.

Yoo D. G., Floyd M., Winn M., Moskowitz S. M., Rada B. 2014. NET formation induced by *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates measured as release of myeloperoxidase-DNA and neutrophil elastase-DNA complexes. Immunol. Lett. 160:186-194.

Zhang X., Ding L., Sandford A. J. 2005. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. BMC Mol Biol.6:4.

http://www.bacterio.net/acinetobacter.html

http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant bacteria/en/

ANEXOS

Explicación de los vídeos (Soporte digital)

Vídeo 1. Videomicroscopía que representa un *time lapse* de una infección de la cepa nº 1 de *A. baumannii* a neutrófilos humanos. Las imágenes del *time lapse* se tomaron una vez transcurridos 30 min de infección. Se muestra a la derecha la tinción del núcleo de los neutrófilos (en azul), en el centro el vídeo correspondiente al contraste de fases y a la izquierda la imagen superpuesta de ambos. Magnificación original: ×200.

Vídeo 2. Videomicroscopía que representa un *time lapse* en microscopía de contraste de fases de un control de neutrófilos sin infectar. Se puede observar la presencia de largas estructuras que prolongan el citoplasma. Magnificación original: ×200.

Vídeo 3. Reconstrucción tridimensional de microscopía confocal que muestra un neutrófilo infectado por *A. baumanii*. El citoplasma del neutrófilo está teñido en verde con Faloidina Atto 488, las bacterias en rojo y el ADN en azul tras marcarlo con DAPI. Magnificación original: ×600.

Vídeo 4. Videomicroscopía que representa un *time lapse* de una infección de la cepa nº 1 de *A. baumannii* en neutrófilos humanos teñidos con STOX Green. Las imágenes del *time lapse* se tomaron una vez transcurridos 30 min de infección. Se muestra cómo, a medida que transcurre el tiempo, el neutrófilo libera su ADN intracelular al medio (teñido en verde con SYTOX Green). Magnificación original: ×200.

Vídeo 5. Videomicroscopía que representa un *time lapse* de microscopía de contraste de fases de una infección de la cepa nº 1 de *A. baumannii* en la línea de macrófagos de ratón J774A.1. Las imágenes del *time lapse* se tomaron una vez transcurridos 30 min de infección. Magnificación original: ×200.


RT² Profiler PCR Array Gene Expression Analysis Report

María Lázaro-Díez

Thursday, March 22, 2018

Sample to Insight

Table of Contents

| Introduction | 1 |
|--|----|
| Summary and workflow | 2 |
| Gene table | 3 |
| Data analysis setup | 5 |
| Data quality control (QC) | 6 |
| Normalization analysis | 7 |
| Results | 8 |
| Fold regulation comparison and p-value | 8 |
| Scatter Plot | 9 |
| Volcano Plot | 12 |
| Heat Map | 15 |
| ClusterGram | 16 |
| What's next? | 17 |
| Gene Expression | 19 |
| DNA Methylation | 19 |
| RNAi | 19 |
| Somatic Mutation | 19 |
| miRNA Regulation | 20 |
| Transcription Factor / Histone | 22 |
| Next steps | 23 |
| Glossary | 24 |

Introduction

Cataloged arrays

RT² Profiler PCR Arrays are highly reliable and sensitive gene expression profiling tools for analyzing focused panels of genes in signal transduction, biological processes or disease research pathways using real-time PCR. Each cataloged RT² Profiler PCR Array contains a list of the pathway-focused genes as well as five housekeeping (reference) genes on the array. In addition, each array contains a panel of proprietary controls to monitor genomic DNA contamination (GDC) as well as the first strand synthesis (RTC) and real-time PCR efficiency (PPC). The qPCR Assays used in PCR Arrays are laboratory-verified and optimized to work under standard conditions enabling a large number of genes to be assayed simultaneously. Their specificity is guaranteed when RT² SYBR Green qPCR Master Mixes are used as part of the complete PCR Array System protocol.

In this study, 96 genes were profiled on 6 samples with the PAHS-018Z.

Summary and workflow

Cataloged arrays

1. Mature RNA was isolated using an RNA extraction kit according to the manufacturer's instructions.

2. RNA quality was determined using a spectrophotometer and was reverse transcribed using a cDNA conversion kit.

3. The cDNA was used on the real-time RT² Profiler PCR Array (QIAGEN, Cat. no. PAHS-018Z) in combination with RT² SYBR® Green qPCR Mastermix (Cat. no. 330529).

 C_T values were exported to an Excel file to create a table of C_T values. This table was then uploaded on to the data analysis web portal at **http://www.qiagen.com/geneglobe**. Samples were assigned to controls and test groups. C_T values were normalized based on a/an Manual Selection of reference genes.

The data analysis web portal calculates fold change/regulation using delta delta C_T method, in which delta C_T is calculated between gene of interest (GOI) and an average of reference genes (HKG), followed by delta-delta C_T calculations (delta C_T (Test Group)-delta C_T (Control Group)). Fold Change is then calculated using 2 ^ (-delta delta C_T) formula. The data analysis web portal also plots scatter plot, volcano plot, clustergram, and heat map.

This data analysis report was exported from the QIAGEN web portal at GeneGlobe.

Gene table

RT² Profiler™ PCR Array Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway

| Position | RefSeq Number | Symbol | Description |
|----------|---------------|---------|---|
| A01 | NM_000061 | BTK | Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase |
| A02 | NM_001228 | CASP8 | Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase |
| A03 | NM_002982 | CCL2 | Chemokine (C-C motif) ligand 2 |
| A04 | NM_000591 | CD14 | CD14 molecule |
| A05 | NM_005582 | CD180 | CD180 molecule |
| A06 | NM_005191 | CD80 | CD80 molecule |
| A07 | NM_006889 | CD86 | CD86 molecule |
| A08 | NM_001278 | CHUK | Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase |
| A09 | NM_014358 | CLEC4E | C-type lectin domain family 4, member E |
| A10 | NM_000758 | CSF2 | Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) |
| A11 | NM_000759 | CSF3 | Colony stimulating factor 3 (granulocyte) |
| A12 | NM_001565 | CXCL10 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 |
| B01 | NM_016581 | ECSIT | ECSIT homolog (Drosophila) |
| B02 | NM_002759 | EIF2AK2 | Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 |
| B03 | NM_005229 | ELK1 | ELK1, member of ETS oncogene family |
| B04 | NM_003824 | FADD | Fas (TNFRSF6)-associated via death domain |
| B05 | NM_005252 | FOS | FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog |
| B06 | NM_002128 | HMGB1 | High mobility group box 1 |
| B07 | NM_005343 | HRAS | V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog |
| B08 | NM_005345 | HSPA1A | Heat shock 70kDa protein 1A |
| B09 | NM_002156 | HSPD1 | Heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin) |
| B10 | NM_024013 | IFNA1 | Interferon, alpha 1 |
| B11 | NM_002176 | IFNB1 | Interferon, beta 1, fibroblast |
| B12 | NM_000619 | IFNG | Interferon, gamma |
| C01 | NM_001556 | IKBKB | Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta |
| C02 | NM 000572 | IL10 | Interleukin 10 |
| C03 | NM_000882 | IL12A | Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1, cytotoxic lymphocyte maturation factor 1, p35) |
| C04 | NM_000575 | IL1A | Interleukin 1, alpha |
| C05 | NM_000576 | IL1B | Interleukin 1, beta |
| C06 | NM_000586 | IL2 | Interleukin 2 |
| C07 | NM_000600 | IL6 | Interleukin 6 (interferon, beta 2) |
| C08 | NM_000584 | CXCL8 | Interleukin 8 |
| C09 | NM_001569 | IRAK1 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 |
| C10 | NM_001570 | IRAK2 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 2 |
| C11 | NM_016123 | IRAK4 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 |
| C12 | NM_002198 | IRF1 | Interferon regulatory factor 1 |
| D01 | NM_001571 | IRF3 | Interferon regulatory factor 3 |
| D02 | NM_002228 | JUN | Jun proto-oncogene |
| D03 | NM_000595 | LTA | Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1) |
| D04 | NM_004271 | LY86 | Lymphocyte antigen 86 |
| D05 | NM_015364 | LY96 | Lymphocyte antigen 96 |
| D06 | NM_002756 | MAP2K3 | Mitogen-activated protein kinase kinase 3 |
| D07 | NM_003010 | MAP2K4 | Mitogen-activated protein kinase kinase 4 |
| D08 | NM_005921 | MAP3K1 | Mitogen-activated protein kinase kinase 1 |
| D09 | NM_003188 | MAP3K7 | Mitogen-activated protein kinase kinase 7 |
| D10 | NM 004834 | MAP4K4 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 |

| Position | RefSeq Number | Symbol | Description |
|----------|---------------|----------|---|
| D11 | NM_002750 | MAPK8 | Mitogen-activated protein kinase 8 |
| D12 | NM_015133 | MAPK8IP3 | Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3 |
| E01 | NM_002468 | MYD88 | Myeloid differentiation primary response gene (88) |
| E02 | NM_003998 | NFKB1 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 |
| E03 | NM_002502 | NFKB2 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100) |
| E04 | NM_020529 | NFKBIA | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha |
| E05 | NM_005007 | NFKBIL1 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like 1 |
| E06 | NM_006165 | NFRKB | Nuclear factor related to kappaB binding protein |
| E07 | NM_003298 | NR2C2 | Nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2 |
| E08 | NM_020651 | PELI1 | Pellino homolog 1 (Drosophila) |
| E09 | NM_005036 | PPARA | Peroxisome proliferator-activated receptor alpha |
| E10 | NM_003690 | PRKRA | Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator |
| E11 | NM_000963 | PTGS2 | Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) |
| E12 | NM_002908 | REL | V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian) |
| F01 | NM_021975 | RELA | V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian) |
| F02 | NM_003821 | RIPK2 | Receptor-interacting serine-threonine kinase 2 |
| F03 | NM_015077 | SARM1 | Sterile alpha and TIR motif containing 1 |
| F04 | NM_021805 | SIGIRR | Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain |
| F05 | NM_006116 | TAB1 | TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 1 |
| F06 | NM_013254 | TBK1 | TANK-binding kinase 1 |
| F07 | NM 182919 | TICAM1 | Toll-like receptor adaptor molecule 1 |
| F08 | NM 021649 | TICAM2 | Toll-like receptor adaptor molecule 2 |
| F09 | NM 001039661 | TIRAP | Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein |
| F10 | NM 003263 | TLR1 | Toll-like receptor 1 |
| F11 | NM 030956 | TLR10 | Toll-like receptor 10 |
| F12 | NM 003264 | TLR2 | Toll-like receptor 2 |
| G01 | NM 003265 | TLR3 | Toll-like receptor 3 |
| G02 | | TLR4 | Toll-like receptor 4 |
| G03 | NM_003268 | TLR5 | Toll-like receptor 5 |
| G04 | NM_006068 | TLR6 | Toll-like receptor 6 |
| G05 | NM_016562 | TLR7 | Toll-like receptor 7 |
| G06 | NM_138636 | TLR8 | Toll-like receptor 8 |
| G07 | NM_017442 | TLR9 | Toll-like receptor 9 |
| G08 | NM_000594 | TNF | Tumor necrosis factor |
| G09 | NM_001065 | TNFRSF1A | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A |
| G10 | NM_019009 | TOLLIP | Toll interacting protein |
| G11 | NM_004620 | TRAF6 | TNF receptor-associated factor 6 |
| G12 | NM_003348 | UBE2N | Ubiquitin-conjugating enzyme E2N |
| H01 | NM_001101 | ACTB | Actin, beta |
| H02 | NM_004048 | B2M | Beta-2-microglobulin |
| H03 | NM_002046 | GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| H04 | NM_000194 | HPRT1 | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 |
| H05 | NM_001002 | RPLPO | Ribosomal protein, large, PO |
| H06 | SA_00105 | HGDC | Human Genomic DNA Contamination |
| H07 | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control |
| H08 | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control |
| H09 | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control |
| H10 | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control |
| H11 | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control |
| H12 | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control |

Data analysis setup

Sample management

| Control Group | Group 1 |
|---------------|---------|
| Neutro | Neutro |
| Neutro | Neutro |
| Neutro | Neutro |

Pre-amplification

A pre-amplification using the appropriate species- and pathway-specific RT² PreAMP Primer Mix was not performed and the appropriate corrections were made during the data analysis procedure.

Lower limit of detection

The $C_{\rm T}\,cut\text{-}off$ was set to 35

Data quality control (QC)

Quality checks performed and results

| Test Performed | Test Result |
|------------------------------|--------------------|
| 1. PCR Array Reproducibility | All Samples Passed |
| 2. RT Efficiency | All Samples Passed |
| 3. Genomic DNA Contamination | All Samples Passed |

Normalization analysis

Manual Selection

| Crowno | Samulas | B2M | GAPDH | Arithmetic Mean | Average Arithmetic |
|---------------|---------|----------|----------|-----------------|--------------------|
| Groups | Samples | | | | Mean |
| Control Group | Neutro | 25 | 32 | 28.50 | 28.83 |
| Control Group | Neutro | 25 | 31 | 28.00 | |
| Control Group | Neutro | 27 | 33 | 30.00 | |
| Group 1 | Neutro | 27 | 32 | 29.50 | 29.17 |
| | | 25, | 30, | | |
| Group 1 | Neutro | 50799823 | 24732127 | 27.50 | |
| | | 0758 | 4204 | | |
| Group 1 | Neutro | 28 | 33 | 30.50 | |

This method allows researchers to select their own internal control / housekeeping / normalization genes for the analysis. Select either the use of the Geometric or Arithmetic Mean consistently across experiments. As a general guide, only select genes with small changes in their expression across different sample groups (differences in C_T values less than 1).

Results

| Control Group | Test Group | Fold Regulation cut off | p-Value cut off | |
|---------------|-------------|-------------------------|-----------------|----------|
| Control Group | Group 1 | 2 | 0.05 | |
| | | | | |
| Position | Gene Symbol | Fold Regulation | p-Value | Comments |
| C05 | IL1B | 32.00 | 0.008350 | A |
| C08 | CXCL8 | | 0.019784 | |
| C10 | IRAK2 | 3.17 | 0.030293 | А |
| E02 | NFKB1 | | 0.024522 | |
| E11 | PTGS2 | 128.00 | 0.007714 | А |
| G08 | TNF | 5.04 | 0.015846 | А |

Fold regulation comparison and p-value

Fold-Change $(2 \ (- \text{ Delta Delta } C_T))$ is the normalized gene expression $(2 \ (- \text{ Delta } C_T))$ in the Test Sample divided the normalized gene expression $(2 \ (- \text{ Delta } C_T))$ in the Control Sample. Fold-Regulation represents fold-change results in a biologically meaningful way. Fold-change values greater than one indicates a positive- or an up-regulation, and the fold-regulation is equal to the fold-change. Fold-change values less than one indicate a negative or down-regulation, and the fold-regulation is the negative inverse of the fold-change.

The p values are calculated based on a Student's t-test of the replicate 2^{-1} (- Delta C_T) values for each gene in the control group and treatment groups.

Scatter Plot



The scatter plot compares the normalized expression of every gene on the array between the two selected groups by plotting them against one another to quickly visualize large gene expression changes. The central line indicates unchanged gene expression. The dotted lines indicate the selected fold regulation threshold. Data points beyond the dotted lines in the upper left and lower right sections meet the selected fold regulation threshold.

Genes Over-Expressed in Group 1 vs. Control Group

| Position | Gene Symbol | Fold Regulation | Comments | RT2 Catalog |
|----------|-------------|-----------------|----------|------------------|
| E11 | PTGS2 | 128.00 | A | <u>PPH01136F</u> |
| C04 | IL1A | | А | <u>PPH00690A</u> |
| C05 | IL1B | 32.00 | А | PPH00171C |
| A01 | BTK | | В | <u>PPH00086A</u> |
| C07 | IL6 | 20.16 | В | PPH00560C |
| B01 | ECSIT | | В | <u>PPH06039A</u> |
| D04 | LY86 | 16.00 | В | <u>PPH06038F</u> |
| C08 | CXCL8 | | | <u>PPH00568A</u> |
| A11 | CSF3 | 12.70 | В | <u>PPH00723B</u> |
| B05 | FOS | | А | <u>PPH00094A</u> |
| H01 | ACTB | 10.08 | А | PPH00073G |
| E09 | PPARA | | В | PPH01281B |
| E02 | NFKB1 | 8.00 | | <u>PPH00204F</u> |
| A08 | CHUK | | В | <u>PPH00649C</u> |
| F07 | TICAM1 | 6.35 | В | PPH06044A |
| G09 | TNFRSF1A | | А | PPH00346C |
| G04 | TLR6 | 6.35 | В | <u>PPH01798E</u> |
| E04 | NFKBIA | | | <u>PPH00170F</u> |
| C09 | IRAK1 | 5.04 | В | <u>PPH00835A</u> |
| F04 | SIGIRR | | В | <u>PPH06049A</u> |
| G08 | TNF | 5.04 | Α | <u>PPH00341F</u> |
| D12 | MAPK8IP3 | | В | <u>PPH06051A</u> |
| B03 | ELK1 | 5.04 | В | PPH00140C |
| G11 | TRAF6 | | В | <u>PPH00329B</u> |
| D06 | MAP2K3 | 5.04 | Α | <u>PPH00747F</u> |
| G10 | TOLLIP | | В | PPH05844C |
| E03 | NFKB2 | 4.00 | A | <u>PPH00782F</u> |
| A10 | CSF2 | | В | PPH00576C |
| E12 | REL | 4.00 | В | <u>PPH00101B</u> |
| F05 | TAB1 | | В | <u>PPH01804B</u> |
| D03 | LTA | 3.17 | В | <u>PPH00337F</u> |
| E05 | NFKBIL1 | | В | <u>PPH01802A</u> |
| G02 | TLR4 | 3.17 | В | <u>PPH01795F</u> |
| A12 | CXCL10 | | В | <u>PPH00765E</u> |
| D10 | MAP4K4 | 3.17 | В | <u>PPH06047A</u> |
| C10 | IRAK2 | | А | PPH01800C |
| C11 | IRAK4 | 3.17 | В | <u>PPH06036A</u> |
| F02 | RIPK2 | | В | PPH00881C |
| F06 | TBK1 | 3.17 | В | <u>PPH01797E</u> |
| D11 | MAPK8 | | В | PPH00720B |

Genes Under-Expressed in Group 1 vs. Control Group

| Position | Gene Symbol | Fold Regulation | Comments | RT2 Catalog |
|----------|-------------|-----------------|----------|------------------|
| E08 | PELI1 | -3.17 | В | <u>PPH06053A</u> |
| A04 | CD14 | -2.52 | В | PPH05723A |
| H10 | PPC | -2.00 | | |

Volcano Plot



The volcano plot helps quickly identify significant gene expression changes. The volcano plot displays statistical significance versus fold-change on the y- and x-axes, respectively. The volcano plot combines a p-value statistical test with the fold regulation change enabling identification of genes with both large and small expression changes that are statistically significant.

Genes Over-Expressed in Group 1 vs. Control Group

| Position | Gene Symbol | Fold Regulation | p-Value | Comments | RT2 Catalog |
|----------|-------------|-----------------|----------|----------|------------------|
| E11 | PTGS2 | 128.00 | 0.007714 | A | <u>PPH01136F</u> |
| C05 | IL1B | | | A | <u>PPH00171C</u> |
| C08 | CXCL8 | 16.00 | 0.019784 | | <u>PPH00568A</u> |
| E02 | NFKB1 | | | | <u>PPH00204F</u> |
| G08 | TNF | 5.04 | 0.015846 | А | <u>PPH00341F</u> |
| C10 | IRAK2 | | | А | PPH01800C |

Genes Under-Expressed in Group 1 vs. Control Group

| Position | Gene Symbol | Fold Regulation | p-Value | Comments | RT2 Catalog |
|----------|-------------|-----------------|---------|----------|-------------|

Heat Map

| Treated Group | Control Group |
|---------------|---------------|
| Group 1 | Control Group |



Magnitude of log2(Fold Change)



| Layout | 01 | 02 | 03 | 04 | 05 | 06 | 07 | 08 | 09 | 10 | 11 | 12 |
|--------|-------|---------|-------|--------|---------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| | BTK | CASP8 | CCL2 | CD14 | CD180 | CD80 | CD86 | CHUK | CLEC4E | CSF2 | CSF3 | CXCL10 |
| A | 20.16 | 1.26 | -1.59 | -2.52 | 1.26 | 1.59 | 1.26 | 8.00 | -1.00 | 4.00 | 12.70 | 3.17 |
| | В | В | В | В | С | В | С | В | А | В | В | В |
| | ECSIT | EIF2AK2 | ELK1 | FADD | FOS | HMGB1 | HRAS | HSPA1A | HSPD1 | IFNA1 | IFNB1 | IFNG |
| В | 20.16 | 2.00 | 5.04 | 1.26 | 10.08 | -1.00 | 1.26 | 1.59 | 1.59 | 1.26 | 1.26 | 1.26 |
| | В | В | В | С | А | В | С | В | В | С | С | С |
| | IKBKB | IL10 | IL12A | IL1A | IL1B | IL2 | IL6 | | IRAK1 | IRAK2 | IRAK4 | IRF1 |
| С | 1.59 | 2.00 | 1.26 | 32.00 | 32.00 | 1.26 | 20.16 | | 5.04 | 3.17 | 3.17 | 1.26 |
| | В | В | С | А | А | С | В | 10.00 | В | А | В | В |
| | IRF3 | JUN | LTA | LY86 | LY96 | MAP2K3 | MAP2K4 | MAP3K1 | MAP3K7 | MAP4K4 | MAPK8 | MAPK8IP3 |
| D | 2.00 | -1.26 | 3.17 | 16.00 | -1.00 | 5.04 | 1.26 | 1.26 | 1.26 | 3.17 | 2.52 | 5.04 |
| | В | В | В | В | В | А | В | В | В | В | В | В |
| | MYD88 | | NFKB2 | | NFKBIL1 | NFRKB | NR2C2 | PELI1 | PPARA | PRKRA | PTGS2 | REL |
| E | 1.59 | | 4.00 | | 3.17 | 1.26 | 2.00 | -3.17 | 8.00 | 1.26 | 128.00 | 4.00 |
| | В | 8.00 | А | 5.04 | В | С | В | В | В | С | А | В |
| | RELA | RIPK2 | SARM1 | SIGIRR | TAB1 | TBK1 | TICAM1 | TICAM2 | TIRAP | TLR1 | TLR10 | TLR2 |
| F | 1.59 | 3.17 | 1.59 | 5.04 | 4.00 | 3.17 | 6.35 | 1.26 | 1.26 | -1.26 | 1.26 | -1.59 |
| | В | В | В | В | В | В | В | С | С | В | С | В |
| | TLR3 | TLR4 | TLR5 | TLR6 | TLR7 | TLR8 | TLR9 | TNF | TNFRSF1A | TOLLIP | TRAF6 | UBE2N |
| G | 1.26 | 3.17 | 1.59 | 6.35 | 1.26 | -1.26 | 1.26 | 5.04 | 6.35 | 4.00 | 5.04 | 1.59 |
| | С | В | В | В | С | В | С | A | A | В | В | В |

The Heat Map provides a visualization of the fold changes in expression between the selected groups for every gene in the array in the context of the array layout. The table provides the fold regulation data used for the map as well as the Comments associated with each one.

ClusterGram



The clustergram performs non-supervised hierarchical clustering of the entire dataset to display a heat map with dendrograms indicating co-regulated genes across groups or individual samples.

What's next?

Thank you for using the RT² Profiler Data Analysis Software.

The Data Analysis software delivers a list of expression changes in the samples from the supplied data. However, this result often only starts an investigation into the underlying mechanisms at work. In order to assist in further analysis, the QIAGEN now utilizes the latest bioinformatics tools to analyze the data and suggest regulatory mechanisms and future experiments. Please review the results from the selected tools below.

Gene Expression: This tool will help define a panel of genes based of this experiment's results. This panel may represent a putative biomarker set, a target gene set or simply a collection of genes. The tool is designed to deliver a list of gene expression assays that would allow the user to follow-up the results of the analyzed experiment.

miRNA Regulation: This tool will identify candidate miRNA regulators in your experimental system. The tool is designed to deliver a list of miRNAs that could be targeting the genes that had observed changes in expression in your selected samples.

DNA Methylation: This tool will help define a panel of differentially expressed genes based on this experiment's results. Altered methylation patterns on the genes' promoters may be responsible for these gene expression changes. This tool is designed to deliver a list of available DNA methylation assays for those differentially expressed genes that would allow the user to follow-up their gene expression experiment with an epigenetic analysis.

Transcription Factor / Histone: This tool will help define a panel of differentially expressed genes based on this experiment's results. Altered transcription factor binding activity on the genes' promoters may be responsible for these gene expression changes. Altered histone modification patterns on the genes' promoters may also be responsible for these gene expression changes. This tool is designed to deliver a list of the transcription factors that might regulate the selected differentially expressed genes as well as the available respective gene-specific real-time PCR assays for DNA from anti-transcription factor or anti-histone chromatin immunoprecipitations. These assays would then allow the user to follow-up their gene expression experiment with an epigenetic analysis.

siRNA: This tool will help define a panel of differentially expressed genes based on this experiment's results. These differentially expressed genes may contribute to the observed differences between the tested sample groups. This tool is designed to deliver a list of differentially expressed genes and corresponding siRNA reagents to test the contribution of each differentially-expressed gene in the experiment. These siRNAs would then allow the user to follow-up their gene expression experiment with a functional analysis.

Somatic Mutation: This tool will help define a panel of genes based on this experiment's results. Mutations in these genes

may affect whether their expression changes have any effect or different effects on the experimental model system. The tool is designed to deliver a list of available somatic mutation assays for these differentially expressed genes that would allow the user to follow-up the results of the analyzed experiment.

Gene Expression, DNA Methylation, RNAi, Somatic Mutation

| Group 1 Control Group 2 0.05 | Test Group | Control Group | Fold Regulation Threshold | p-Value Threshold |
|------------------------------|------------|---------------|---------------------------|-------------------|
| | Group 1 | Control Group | 2 | 0.05 |

| Position | Symbol | Fold Regulation | p-Value | RT2 qPCR Assay | EpiTect Methyl II | | Somatic Mutation |
|----------|--------|-----------------|----------|----------------|-------------------|--------------------|------------------|
| | | | | | qPCR Assay | FIEXITODE SIKINA | Assay |
| E11 | PTGS2 | 128.00 | 0.007714 | PPH01136F | EPHS101148-1A | <u>View siRNAs</u> | <u>Inquire</u> |
| C05 | IL1B | | 0.008350 | PPH00171C | <u>Inquire</u> | View siRNAs | <u>Inquire</u> |
| C08 | CXCL8 | 16.00 | 0.019784 | PPH00568A | <u>Inquire</u> | View siRNAs | <u>Inquire</u> |
| E02 | NFKB1 | 8.00 | 0.024522 | PPH00204F | EPHS111169-1A | <u>View siRNAs</u> | <u>Inquire</u> |

miRNA Regulation

| Test Group | Control Group | Fold Regulation Threshold | p-Value Threshold |
|------------|---------------|---------------------------|-------------------|
| Group 1 | Control Group | 2 | 0.05 |

Genes Under-Expressed in Group 1 vs. Control Group

Position Gene Symbol Fold Regulation p-Value

miRNA Regulating Genes Under-Expressed in Group 1 vs. Control Group

| Strongest Strength | miScript Account | miScript Mimic | miScript Inhibitor | Taraat Ganas |
|--------------------|------------------|----------------|--------------------|--------------|
| Score | miscripi Assuy | | | luiger Genes |

Genes Over-Expressed in Group 1 vs. Control Group

| Position | Gene Symbol | Fold Regulation | p-Value |
|----------|-------------|-----------------|----------|
| E11 | PTGS2 | 128.00 | 0.007714 |
| C05 | IL1B | 32.00 | 0.008350 |
| C08 | CXCL8 | 16.00 | 0.019784 |
| E02 | NFKB1 | 8.00 | 0.024522 |

miRNA Regulating Genes Over-Expressed in Group 1 vs. Control Group

| miRNA Name | Strongest Strength | miScript Assay | miScript Mimic | miScript Inhibitor | Target Genes |
|-------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------|
| hsa-miR-548n | -0.58 | MS00014798 | MSY0005916 | MIN0005916 | NFKB1 |
| hsa-miR-548l | -0.52 | MS00014784 | MSY0005889 | MIN0005889 | NFKB1 |
| hsa-miR-26a-5p | -0.49 | <u>MS00006559</u> | <u>MSY0000082</u> | <u>MIN0000082</u> | PTGS2 |
| hsa-miR-26b-5p | -0.49 | MS00003234 | MSY0000083 | <u>MIN0000083</u> | PTGS2 |
| hsa-miR-1297 | -0.49 | <u>MS00014567</u> | <u>MSY0005886</u> | <u>MIN0005886</u> | PTGS2 |
| hsa-miR-548p | -0.46 | <u>MS00014812</u> | <u>MSY0005934</u> | <u>MIN0005934</u> | NFKB1 |
| hsa-miR-508-3p | -0.45 | <u>MS00009863</u> | <u>MSY0002880</u> | <u>MIN0002880</u> | NFKB1 |
| hsa-miR-513b-5p | -0.44 | <u>MS00009919</u> | <u>MSY0005788</u> | <u>MIN0005788</u> | PTGS2 |
| hsa-miR-548i | -0.37 | MS00014763 | <u>MSY0005935</u> | <u>MIN0005935</u> | NFKB1 |
| hsa-miR-559 | -0.36 | <u>MS00004683</u> | <u>MSY0003223</u> | <u>MIN0003223</u> | NFKB1 |
| hsa-miR-101-3p | -0.36 | <u>MS00007595</u> | <u>MSY0000099</u> | <u>MIN0000099</u> | PTGS2 |
| hsa-miR-548b-5p | -0.34 | <u>MS00010115</u> | <u>MSY0004798</u> | <u>MIN0004798</u> | NFKB1 |
| hsa-miR-548d-5p | -0.34 | <u>MS00010136</u> | MSY0004812 | MIN0004812 | NFKB1 |
| hsa-miR-548c-5p | -0.34 | <u>MS00010129</u> | MSY0004806 | <u>MIN0004806</u> | NFKB1 |
| hsa-miR-548a-5p | -0.34 | <u>MS00010108</u> | <u>MSY0004803</u> | <u>MIN0004803</u> | NFKB1 |
| hsa-miR-548j-5p | -0.31 | <u>MS00014770</u> | <u>MSY0005875</u> | <u>MIN0005875</u> | NFKB1 |
| hsa-miR-548h-5p | -0.31 | MS00014756 | MSY0005928 | <u>MIN0005928</u> | NFKB1 |
| hsa-mi R -1179 | -0.27 | <u>MS00014084</u> | MSY0005824 | <u>MIN0005824</u> | NFKB1 |
| hsa-mi R -605-5p | -0.25 | <u>MS00004998</u> | MSY0003273 | <u>MIN0003273</u> | NFKB1 |
| hsa-miR-338-5p | -0.22 | <u>MS00009478</u> | <u>MSY0004701</u> | <u>MIN0004701</u> | NFKB1 |

Transcription Factor / Histone

| Test Group | Control Group | Fold Regulation Threshold | p-Value Threshold |
|------------|---------------|---------------------------|-------------------|
| Group 1 | Control Group | 2 | 0.05 |

Genes Differentially Expressed in Group 1 vs. Control Group

| Desition | Gene Symbol | Fold | a Value | Turner stintion Eastern | EpiTect ChIP qPCR |
|----------|-------------|------------|----------|---|--------------------------|
| Position | | Regulation | p-value | Iranscription ractors | Assay |
| F11 | PTGS2 | 128.00 | 0.007714 | p53, USF-1, USF1, NF-kappaB1, NF-kappaB, | CPH1015233()01A |
| | F1032 | 120.00 | | NF-kappaB2, NF-kappaB1, RelA, NF-kappaB | <u>OITT013233(-)01A</u> |
| C05 | II 1 B | 22.00 | 0.008350 | TBP, TBP, TFIID, C/EBPbeta, c-Rel, RelA, NF-AT, | CPH1021404()01A |
| 05 | | 32.00 | | NF-AT1, NF-AT2, NF-AT3, NF-AT4 | <u>OITTI021494(-)01A</u> |
| C08 | CXCL8 | 16.00 | 0.019784 | C/EBPalpha | <u>GPH1010058(-)01A</u> |
| | | | | Sp1, POU2F1, POU2F1a, Oct-B1, oct-B2, oct-B3, | |
| | NFKB1 | 8.00 | 0.024522 | POU2F2, POU2F2 (Oct-2.1), POU2F2B, POU2F2C, | |
| E02 | | | | p53, p53, ReIA, STAT3, Pax-4a, MZF-1, p300, ATF, | |
| | | | | ATF-2, c-Jun, ATF6, CREB, deltaCREB, AP-2rep, lk-1, | <u>OITI1010144(-j01A</u> |
| | | | | NF-kappaB1, NF-kappaB, NF-kappaB2, c-Rel, | |
| | | | | NF-kappaB1, RelA, NF-kappaB | |

Next steps

After using QIAGEN's RT² Profiler PCR array, use the upregulated or downregulated qPCR assays to further validate your hypothesis.

You can use individual qPCR RT² assays or create custom RT² PCR arrays.

Further, you can use the assay and other products discussed above in the "What's next?" section to design additional studies on the expression and function of miRNAs regulating the differentially expressed genes, somatic mutations in those genes, epigenetic marks (such as modified histones, transcription factor binding, and DNA methylation) at the promoters of those genes, or study the genes' function using gene-specific siRNA.

Glossary

Comments

A: This gene's average threshold cycle is relatively high (> 30) in either the control or the test sample, and is reasonably low in the other sample (< 30). These data mean that the gene's expression is relatively low in one sample and reasonably detected in the other sample suggesting that the actual fold-change value is at least as large as the calculated and reported fold-change result. This fold-change result may also have greater variations if p value > 0.05; therefore, it is important to have a sufficient number of biological replicates to validate the result for this gene.

B: This gene's average threshold cycle is relatively high (> 30), meaning that its relative expression level is low, in both control and test samples, and the p-value for the fold-change is either unavailable or relatively high (p > 0.05). This fold-change result may also have greater variations; therefore, it is important to have a sufficient number of biological replicates to validate the result for this gene.

C: This gene's average threshold cycle is either not determined or greater than the defined cut-off (default 35), in both samples meaning that its expression was undetected, making this fold-change result erroneous and un-interpretable.







Wicrobes and Infection www.elsevier.com/locate/micinf

Short communication

Acinetobacter baumannii and A. pittii clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells *in vitro*

María Lázaro-Díez^{a,b}, Teresa Navascués-Lejarza^a, Sara Remuzgo-Martínez^a, Jesús Navas^c, José Manuel Icardo^d, Felix Acosta^e, Luis Martínez-Martínez^{a,b,c,f}, José Ramos-Vivas^{a,b,f,*}

^a Instituto de Investigación Valdecilla IDIVAL, Santander, Cantabria, Spain

^b Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Cantabria, Spain

^c Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

^d Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander, Spain

^e Grupo de Investigación en Acuicultura, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, Spain ^f Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Received 14 December 2015; accepted 12 May 2016

Available online 24 May 2016

Abstract

The molecular and genetic basis of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii* virulence remains poorly understood, and there is still lack of knowledge in host cell response to these bacteria. In this study, we have used eleven clinical *Acinetobacter* strains (*A. baumannii* n = 5; *A. pittii* n = 6) to unravel bacterial adherence, invasion and cytotoxicity to human lung epithelial cells. Our results showed that adherence to epithelial cells by *Acinetobacter* strains is scarce and cellular invasion was not truly detected. In addition, all *Acinetobacter* strains failed to induce any cytotoxic effect on A549 cells.

© 2016 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Acinetobacter baumannii; Acinetobacter pittii; Adherence; Cytotoxicity; Epithelial cells

1. Introduction

Acinetobacter baumannii and Acinetobacter pittii cause various types of human infections, including pneumonia, bacteraemia, wound infections, meningitis and urinary tract infections [1,2]. Acinetobacter species are inherently resistant to several antibiotics or capable of readily acquiring resistance and clinical isolates are able to rapidly spread among patients and survive in the hospital environment [3,4].

Since adherence of bacteria to cells is considered as an essential first step in bacterial pathogenesis, *in vitro* cell culture methods provide a useful tool to investigate the

interactions between pathogens and the human epithelium that occurs during infections. After adhesion, invasion of host nonphagocytic cells may be exploited by pathogens to avoid the hostile environment, therefore facilitating their dissemination. In this regard, attempts have been made to elucidate the mechanisms by which *A. baumannii* promotes adherence to host cells. Moreover, whether *Acinetobacter* spp. are facultative intracellular pathogens or not has been a subject of debate because both the host cells surface factors or bacterial adhesins that mediate adherence of *A. baumannii* are largely uncharacterized, the intracellular trafficking of the bacteria is not clear and there is a lack of evidence for intracellular replication or long term intracellular survival inside cells.

In this work, eleven *Acinetobacter* strains isolated from human patients were analysed for adherence, internalization and cytotoxic capacity in the A549 cell line in order to better understand their mechanisms of pathogenicity.

http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.05.002

1286-4579/© 2016 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

^{*} Corresponding author. Instituto de Investigación Valdecilla IDIVAL, Santander, Cantabria, Spain. Tel.: +34 942 315515x73172; fax: +34 942 315517.

E-mail address: jvivas@idival.org (J. Ramos-Vivas).

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

Eleven Acinetobacter strains were used (Supplementary Table 1). All strains were isolated as pure cultures from clinical samples at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (HUMV). The strains were routinely cultured on blood agar (BA) plates, brain hearth infusion broth (BHIB) or Luria Bertani broth (LB) at 37 °C, and frozen at -80 °C with 20% glycerol. As control for specific adherence experiments, one strain of *Haemophilus influenzae* (HiNT 375) was used [5]. As a control for bacterial cytotoxicity, *Serratia liquefaciens* strain (HUMV-3250) was used [6].

2.2. Transmission electron microscopy

All *Acinetobacter* strains were examined by transmission electron microscopy (TEM) after growth at 37 °C in LB, BHIB or BA to confirm the presence of fimbriae. Bacteria were applied to Formvar-coated grids, negatively stained with 1% phosphotungstic acid and finally examined with a JEM-1011 transmission electron microscope (JEOL) operating at 80 kV.

2.3. Scanning electron microscopy

Coverslips containing infected cultures (*Acinetobacter*, *Haemophilus* or *Serratia*) or cells challenged with bacterial extracellular products (ECPs) were fixed in ice-cold 3% glutaraldehyde for 20 min at 4 °C. Samples were dehydrated in a series of graded acetone, dried by the critical point method, coated with gold in a Fine coat ion sputter JFC-1100 226 (JEOL, Ltd) and observed with an Inspect S microscope (FEI Company) working at 15 kV or 20 kV.

2.4. Adherence and invasion experiments

Adherence and invasion experiments by all strains were performed as previously described [7]. The human lung epithelial A549 (ATCC CCL185) cell line was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum and 2 mM L-glutamine.

In order to clarify if *Acinetobacter* strains prefer the cell surface or the inert surface for adherence inside cell culture plates, we perform the following experiment. A549 cells were plated at a density of 1.9×10^5 cells/well (~100% confluence) or at one half, 9.5×10^4 cells/well (~50% confluence), into 24-well tissue culture plates. In the case that *Acinetobacter* prefer the cellular surface for adherence, we will expected to obtain more CFUs in the wells with more cells/less inert surface exposed (~100% confluence). However, if *Acinetobacter* prefer the inert surface instead the cell surface (plastic, or glass coverslips in IF experiments), we will expect more CFUs after adherence experiments in the wells with less cells/more inert surface exposed (~50% confluence).

Strains of Acinetobacter were cultured overnight in 10 ml of BHIB at 37 °C with moderate shaking at 175 rpm. Bacterial suspensions were washed in phosphate-buffered (PBS) adjusted to saline and approximately 5.5×10^9 CFU ml⁻¹ (OD₆₂₀ = 0.5). A549 cells were infected with bacteria at a multiplicity of infection (MOI, bacterium: eukaryotic cell ratio) of ~100:1 (~100% cell confluence) or ~200:1 (~50% cell confluence). The number of CFUs inoculated per well was determined by serial dilution in PBS and plating on BA and incubated for 48 h. The infected plates were centrifuged for 4 min at $200 \times g$ prior to the incubation to promote adherence of bacteria to cells and to synchronize infections. Infected monolayers were then incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 90 min. For quantification of adherent bacteria, external non-adherent bacteria were removed by washing the cells four times with PBS, and then disrupted by addition of 100 µl Triton X-100 (1% in PBS) per well. Serial dilutions of the disrupted mixture were plated onto BA and incubated for 48 h at 37 °C. Adherence of Acinetobacter strains was calculated as the average of the total number of CFUs per total initial inoculum and expressed as a percentage. Adherence experiments were repeated five times.

For prolonged intracellular survival experiments, four strains (two *A. baumannii* and two *A. pittii*) were arbitrarily selected. The MIC of gentamicin for these was determined by using the microdilution method and results were interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). After infections with these four strains, cells were incubated for 2 h and after extracellular killing of bacteria by gentamicin (75–300 µg ml⁻¹), cells were washed and culture medium was replaced by medium containing 200 µg ml⁻¹ gentamicin, incubated for a further 2 h, and lysed as described before. After this time, number of putative viable intracellular bacteria was counted. Parallel samples were processed for immunofluorescence microscopy.

As positive control for bacterial adherence to epithelial cells or cytotoxicity, A549 cell cultures were infected with, *H. influenzae* or *S. liquefaciens* strains at a MOI of ~100:1 for 90 min, and processed for SEM. Control cultures were incubated with the same volumes using fresh bacterial culture medium or cell culture medium.

2.5. Immunofluorescence

Adherence, invasion and differential double immunofluorescent labelling experiments were performed as previously described [7]. For double immunofluorescence assays, strains *A. baumannii* ATCC 19606^T and *A. pittii* LMG 10559 were used to produce polyclonal sera as previously described [7]. Cells were infected for 3–4 h and all preparations were examined with a Nikon A1R confocal scanning laser microscope equipped with 403 nm, 488 nm and 561 nm lasers. Images were captured at random with a ×20 Plan-Apo 0.75 NA, ×40 Plan-Fluor 1,3 NA or ×100 Apo-TIRF 1,49 NA objectives, and processed using the NIS-Elements 3.2 software.

2.6. Cytotoxicity of bacterial extracellular products (ECPs)

To determine the cytotoxic potential of the ECPs present in Acinetobacter culture supernatants, infection experiments were performed as previously described [6]. A549 monolayers were incubated for periods up to 24 h and processed for immunofluorescence or SEM. The cytotoxic S. liquefaciens strain was used to observe cellular deformations and detachment of the cell monolaver. Control cultures were incubated with the same volumes using fresh bacterial culture medium.

2.7. MitoTracker staining

After exposure to bacteria or Acinetobacter ECPs, cells were stained with MitoTracker Red CMX-Ros (Molecular Probes) as previously described [7]. Then, cells were fixed and processed for immunofluorescence staining with Atto-488 phalloidin. For MitoTracker Red, a 540-590-nm excitation, 600-650-nm emission filter was used. For NucBlue, a 375-390-nm excitation, 420-490-nm emission filter was used. Images were captured at random with a $\times 20$ Plan-Apo 0.75 NA objective, and processed using the NIS-Elements 3.2 software.

3. Results

3.1. Bacterial morphology of A. baumannii and A. pittii

First, we examined the bacterial morphology of the Acinetobacter reference strains and clinical isolates with SEM and TEM. The morphology of bacteria varied notably in A. pittii strains. Representative SEM images of selected strains are shown in Supplementary Fig. 1A. Interestingly, all Acinetobacter strains were fimbriated at 37 °C independently of the culture conditions used (LB, BHIB or BA). Fimbriae were clearly visible under TEM (Supplementary Fig. 1B). Second, we wanted to know if our isolates of the two clinically relevant Acinetobacter species have similar or different immunofluorescence patterns, and we develop an antibody against each species. The homologous antiserum reacted efficiently and equally well with all the strains of the same species used (i.e. A. baumannii antibody Vs A. baumannii strains), but when a heterologous antibody was used to stain a different species (i.e. A. baumannii antibody Vs A. pittii strains), the pattern of fluorescence changed and each antibody showed reduced or no reactivity. A representative immunofluorescence assay with the different Acinetobacter strains grown in liquid media at 37 °C and tested with the antisera (A. baumannii strains with the A. baumannii antibody and A. pittii with the A. pittii antibody) is shown in Supplementary Fig. 2.

3.2. Adherence to epithelial cells

The percentage of adherence correlated well with the attachment of A. baumannii to the inert surfaces (wells with ~50% confluence) but not with the attachment to epithelial cells (~100% confluence) (Fig. 1). Adherence to A549 epithelial cells by A. pittii seemed to be different (more CFUs attached to monolayers with ~100% confluence), but overall, after five independent experiments, the differences were not statistically significant (p < 0.05) under both conditions.

However, images of immunofluorescence and SEM clearly indicated that bacteria were not specifically attached to A549 cells (Fig. 2). Only one strain of A. pittii (nº 9) seemed to be randomly attached to both cells and inert surfaces (Fig. 2F and F'). Similar results were found using LB, BHIB or BA to grow the strains before immunofluorescence experiments. Furthermore, using *H. influenzae* as a control for specific adherence to A549 monolayers, we found a different but expected result; the strain adheres very well to epithelial cells and not to the plastic or glass surface (Supplementary Fig. 3A).

3.3. Invasion of A549 cells by Acinetobacter strains

Using double immunofluorescence labelling and confocal microscopy in A549 infected cultures to differentiate extracellular bacteria from intracellular bacteria, not intracellular Acinetobacter were detected, even after 4 h of infection (Fig. 3 and data not shown).

Interestingly, several images showed intracellular particles from bacterial origin (well stained with the respective Acinetobacter antibody). These particles have a small size (<200 nm) and we assume that these structures correspond to droplets or vesicles liberated from bacteria. In fact, using SEM, we have observed small spherical particles (<200 nm) in cells infected with different strains, and also in TEM and immunofluorescence images obtained from Acinetobacter liquid cultures (Supplementary Fig. 4).

The MICs used in gentamicin protection assays (strains nº 1, 2, 8 and 9) were 2 μ g ml⁻¹, >256 μ g ml⁻¹, 2 μ g ml⁻¹ and 4 μ g ml⁻¹, respectively. In these assays, after infection of monolayers, 75 μ g ml⁻¹ gentamicin was able to kill all bacteria of one A. baumannii strain and of two A. pittii strains. However, A. baumannii strain (nº 2) resisted up to $300 \ \mu g \ ml^{-1}$ gentamicin (Supplementary Fig. 5).

30

25

20

15



wells and all data are given as mean \pm SE from five independent experiments.



Fig. 2. Adherence of *Acinetobacter* strains to the A549 cell line. Cells were infected for 90 min. A–C, SEM microphotographs. A, *A. baumannii* n° 1; B, *A. pittii* n° 8; C, *A. pittii* n° 9. D–F', Immunofluorescence images. Left panels $(1.9 \times 10^5 \text{ cells})$, right panels $(9.5 \times 10^4 \text{ cells})$. Cells were stained with Atto 488 phalloidin and DAPI, and bacteria are shown in red. D, D' *A. baumannii* n° 1; E, E' *A. baumannii* n° 5; F, F' *A. pittii* n° 9. SEM micrographs were originally captured at ×1000 (A), ×1500 (B) and ×2500 (C) magnification. Bars: A, B 50 µm, C, 40 µm. For immunofluorescence, micrographs were originally captured at ×200 magnification. Bars: 10 µm.

3.4. Cytotoxic effects of Acinetobacter on epithelial cells and MitoTracker staining

Cytotoxicity was not detected in A549 cells infected with *Acinetobacter* strains, up to 3 h after of infection, independently of the culture conditions or MOI used. Also, we incubated A549 cells with ECPs produced by all the *Acinetobacter* strains during growth in liquid medium (LB or BHIB) and no

cytotoxicity was observed after 24 h of incubation with increasing volumes of bacterial ECPs (not shown). As a control, the cytotoxic *S. liquefaciens* strain induced cytotoxicity in A549 cells as early as 60 min post-challenge (Supplementary Fig. 3B). Furthermore, MitoTracker staining was performed on live cells challenged with bacteria or bacterial ECPs. The fluorescence intensity and the appearance of the mitochondrial network of the challenged cells with *Acinetobacter* strains or



Fig. 3. Double immunofluorescence of *Acinetobacter* in A549 cells. A549 cells were infected for 3 h with *Acinetobacter* strains, fixed and processed for double-immunofluorescence labelling. A, *A. baumannii* n° 1; B, *A. pittii* n° 9. Extracellular bacteria were detected with anti-*Acinetobacter* rabbit antibody on non-permeabilized cells and total bacteria (extracellular and intracellular) were detected with the same antibody on permeabilized cells. In merged images, extracellular bacteria are shown in yellow and putative intracellular bacteria in red. DAPI-stained nuclei are shown in blue. Arrows indicate putative intracellular particles from bacterial origin, with spherical shape. All immunofluorescence experiments were repeated at least three times. Micrographs were originally captured at $\times 200$ magnification. Scale bars: 25 µm.

ECPs were not significantly altered compared to control cells. However, the fluorescence intensity in the mitochondria of the *Serratia*-infected cells decreased after infection. Examples are shown in Supplementary Fig. 6.

4. Discussion

Knowledge of *Acinetobacter* virulence factors and their role in pathogenesis is scarce. Also, to the best of our knowledge, there are no detailed published reports on the interactions between *A. pittii* and human epithelial cells.

Since pulmonary compartments are the most favoured site for *A. baumannii* infection, and nosocomial (particularly ventilator-associated) pneumonia is common [8,9], the human lung epithelial A549 cell line is frequently used as a model system for investigating the interaction between these microbial pathogens and mammalian cells *in vitro*. Overall, the *A. baumannii* and *A. pittii* strains used in this study adhered poorly to A549 cells despite variable numbers of CFUs can be easily obtained from adherence experiments. These CFU numbers were due to inconsistent attachment to the inert surface (and not to cells) for *A. baumannii* and from random attachment (to cells and inert surfaces) for some *A. pittii* strains. The positive control (*H. influenzae*) demonstrated higher levels of specific adherence to these cells, further validating our model.

Double immunofluorescence staining and gentamicin protection assays also substantiated the non-adherent non-invasive phenotype of our A. baumannii and A. pittii strains. Thus, under the conditions tested, the Acinetobacter strains appeared to lack (or failed to express) the necessary factors required for adhesion and invasion in vitro to the cell line used in this study. This is in contrast to reports by others, assuming that all colony forming units obtained on bacteriological media after lysis of A549infected cultures or other cell types came from cell-attached Acinetobacter [10-14]. Furthermore, several studies have suggested that some A. baumannii strains are adherent and invasive after performing long time infections (up to 4-5 h) and antibiotic protection assays, with different concentrations of the antimicrobial agent, typically gentamicin. Our results showed that for some susceptible Acinetobacter strains, already at the lower concentration of gentamicin used (75 μ g ml⁻¹) effectively kill extracellular bacteria. On the other hand, one A. *baumannii* strain (n° 2) resisted up to 300 μ g ml⁻¹ of gentamicin. Therefore, MIC antimicrobial determination is mandatory for every Acinetobacter strain. Moreover, as this sort of assay is based on the recovery of viable bacteria after their internalization by eukaryotic cells, it does not discriminate between efficient bacterial invasion in combination with low intracellular survival or low invasiveness in combination with effective intracellular multiplication or survival [15]. In the light of the above techniques used, we believe that results based on serial CFU counts in adherence and invasion experiments with Acinetobacter isolates need careful interpretation, because most bacteria remain attached to abiotic surfaces (glass or plastic) and not to eukaryotic cells and, therefore, such assays have to be complemented with microscopic evaluation of infected cells [16].

Acinetobacter strains used in this study were also not cytotoxic in A549 cells. These results are in contrast with those of others studying *A. baumannii* with the same or with different cell lines [13]. The same negative results were obtained with six strains of *A. pittii*, indicating that, in *Acinetobacter*, a generalization on toxicity is not correct.

Finally, as recent studies suggest that the inflammatory response induced by *A. baumannii* in human epithelial cells is dependent on bacterial invasion and intracellular survival [17,12], the less adherent not-invasive strains (as those of the present study) may prevent the secretion of pro-inflammatory cytokines and chemokines by lung epithelial cells, and hence the activation of the innate immune system. New knowledge through a deeper study on the modulation and regulation of cytokines, chemokines and their receptors in epithelial cells by *Acinetobacter* may prove helpful in understanding the pathogenesis of this bacterial genus.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

M.L.D. holds a contract from the Instituto de Investigación Valdecilla IDIVAL. The authors thank Dr. Fidel Madrazo (Electron Microscopy Unit, Technology Support Services, IDIVAL) for helping with confocal microscopy, and Dr. Junkal Garmendia (CSIC-Pamplona) for providing *H. influenzae* strain. JRV holds a Miguel Servet II contract for Young Researchers from the Instituto de Salud Carlos III (grant PI13/ 01310), Spain. Research in our laboratories is supported by Plan Nacional de I+D+i 2008–2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) — co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2016.05.002.

References

- Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen. Virulence 2012;3:243–50.
- [2] Roca I, Espinal P, Vila-Farres X, Vila J. The Acinetobacter baumannii oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. Front Microbiol 2012;3:148.
- [3] Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. Int J Antimicrob Agents 2013;41:11–9.
- [4] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Nat Rev 2007;5:939–51.
- [5] Morey P, Cano V, Marti-Lliteras P, Lopez-Gomez A, Regueiro V, Saus C, et al. Evidence for a non-replicative intracellular stage of nontypable *Haemophilus influenzae* in epithelial cells. Microbiology 2011;157: 234–50.

- [6] Remuzgo-Martinez S, Aranzamendi-Zaldunbide M, Pilares-Ortega L, Icardo JM, Acosta F, Martinez-Martinez L, et al. Interaction of macrophages with a cytotoxic *Serratia liquefaciens* human isolate. Microbes Infect 2013;15:480–90.
- [7] Ramos-Vivas J, Pilares-Ortega L, Remuzgo-Martinez S, Padilla D, Gutierrez-Diaz JL, Navas-Mendez J. *Rhodococcus equi* human clinical isolates enter and survive within human alveolar epithelial cells. Microbes Infect 2011;13:438–46.
- [8] Nunley DR, Bauldoff GS, Mangino JE, Pope-Harman AL. Mortality associated with *Acinetobacter baumannii* infections experienced by lung transplant recipients. Lung 2010;188:381–5.
- [9] Behnia M, Logan SC, Fallen L, Catalano P. Nosocomial and ventilatorassociated pneumonia in a community hospital intensive care unit: a retrospective review and analysis. BMC Res Notes 2014;7:232.
- [10] Eijkelkamp BA, Stroeher UH, Hassan KA, Papadimitrious MS, Paulsen IT, Brown MH. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. FEMS Microbiol Lett 2011;323: 44–51.
- [11] Jacobs AC, Hood I, Boyd KL, Olson PD, Morrison JM, Carson S, et al. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. Infect Immun 2010;78:1952–62.
- [12] de Breij A, Gaddy J, van der Meer J, Koning R, Koster A, van den Broek P, et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606(T) to human airway epithelial cells and their inflammatory response. Res Microbiol 2009; 160:213–8.
- [13] Krzyminska S, Frackowiak H, Kaznowski A. Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex strains induce caspase-dependent and caspaseindependent death of human epithelial cells. Curr Microbiol 2012;65: 319–29.
- [14] Na IY, Chung ES, Jung CY, Kim DH, Shin J, Kang K, et al. Comparison of the virulence-associated phenotypes of five species of *Acinetobacter baumannii* complex. J Microbiol Biotechnol 2016;26:171–9.
- [15] Booth JW, Telio D, Liao EH, McCaw SE, Matsuo T, Grinstein S, et al. Phosphatidylinositol 3-kinases in carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule-mediated internalization of *Neisseria gonorrhoeae*. J Biol Chem 2003;278:14037–45.
- [16] Heesemann J, Laufs R. Double immunofluorescence microscopic technique for accurate differentiation of extracellularly and intracellularly located bacteria in cell culture. J Clin Microbiol 1985;22:168–75.
- [17] Bist P, Dikshit N, Koh TH, Mortellaro A, Tan TT, Sukumaran B. The Nod1, Nod2, and Rip2 axis contributes to host immune defense against intracellular *Acinetobacter baumannii* infection. Infec Immun 2014;82: 1112–22.












SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Received: 16 December 2016 Accepted: 22 May 2017 Published online: 04 July 2017

Human neutrophils phagocytose and kill *Acinetobacter baumannii* and *A. pittii*

María Lázaro-Díez^{1,2,8}, Itziar Chapartegui-González^{1,2}, Santiago Redondo-Salvo¹, Chike Leigh³, David Merino^{1,4}, David San Segundo^{1,4}, Jesús Navas^{1,5}, José Manuel Icardo⁶, Félix Acosta⁷, Alain Ocampo-Sosa^{1,2,8}, Luis Martínez-Martínez^{8,9,10} & José Ramos-Vivas^{1,2,8}

Acinetobacter baumannii is a common cause of health care associated infections worldwide. A. pittii is an opportunistic pathogen also frequently isolated from Acinetobacter infections other than those from A. baumannii. Knowledge of Acinetobacter virulence factors and their role in pathogenesis is scarce. Also, there are no detailed published reports on the interactions between A. pittii and human phagocytic cells. Using confocal laser and scanning electron microscopy, immunofluorescence, and live-cell imaging, our study shows that immediately after bacteria-cell contact, neutrophils rapidly and continuously engulf and kill bacteria during at least 4 hours of infection *in vitro*. After 3 h of infection, neutrophils start to release neutrophil extracellular traps (NETs) against Acinetobacter. DNA in NETs colocalizes well with human histone H3 and with the specific neutrophil elastase. We have observed that human neutrophils use large filopodia as cellular tentacles to sense local environment but also to detect and retain bacteria during phagocytosis. Furthermore, co-cultivation of neutrophils with human differentiated macrophages before infections shows that human neutrophils, but not macrophages, are key immune cells to control Acinetobacter. Although macrophages were largely activated by both bacterial species, they lack the phagocytic activity demonstrated by neutrophils.

Acinetobacter baumannii has been extensively studied because infections caused by this pathogen have been associated with high morbidity and mortality rates^{1, 2}. Also, their ability to survive in dry conditions and their resistance to disinfectants allows these microorganisms to survive in the hospital environment^{3, 4}. Furthermore, this organism frequently presents multidrug or pan-resistance^{5, 6}. Due to those three attributes (survival in the hospital environment, antimicrobial resistance and virulence) it is likely that this organism will gain even increasing importance in the near future. Among Acinetobacter genus, A. pittii is another clinically relevant species. The significant role of A. pittii in human infections and the emergence of resistant strains have also become a great medical concern^{7–9}.

When Acinetobacter strains penetrate epithelial barriers and invade the host tissues, they first encounter the so-called "professional phagocytes," macrophages and neutrophils. Professional phagocytes play a key role in host defence by engulfing and killing microorganisms. Little is known about the relative contribution of macrophages and neutrophils in the initial phase of encounter with Acinetobacter strains.

Neutrophils (also known as polymorphonuclears, PMNs) are the most abundant leukocytes in the blood which are rapidly recruited to the inflammatory site upon inflammation. Neutrophils can eliminate microbes using three basic strategies: phagocytosis, degranulation, and by a recently discovered mechanism called NETosis, a specific type of cell death different from both necrosis and apoptosis^{10–13}. Bacterial metabolites and

¹Instituto de Investigación Valdecilla IDIVAL, Santander, 39011, Spain. ²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, 39008, Spain. ³New York University School of Medicine, New York, 10003, USA. ⁴Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, 39008, Spain. ⁵Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander, 39011, Spain. ⁶Departamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander, 39011, Spain. ⁷Grupo de Investigación en Acuicultura, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Gran Canaria, 35214, Spain. ⁸Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, 28029, Spain. ⁹Unidad de Gestión Clínica de Microbiología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, 14004, Spain. ¹⁰Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, 14004, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.R.-V. (email: jvivas@idival.org)



Figure 1. Contact and phagocytosis of *Acinetobacter* by human neutrophils. Human neutrophils were infected for 30 min (**a**), 60 min (**b**,**c**) or 2 h (**d**-**f**) with *A. baumannii* ATCC 19606^T, fixed and processed for immunofluorescence labelling. Bacteria were detected with anti-*A. baumannii* rabbit antibody (red). Actin cytoskeleton was labelled with Atto 488 phalloidin (green) and nuclei are stained with DAPI (blue) (**a**-**c**,**f**). (**a**) Single stack; (**b** and **d**-**f**) maximal projections; (**c**) cross-sectional view. Arrow in (**b**) indicates a pseudopod in close contact with a bacterium. In (**d**,**e**) double-immunofluorescence images show extracellular bacteria (green), debris of intracellular bacteria (red) and bacterial and cellular DNA (blue). (**f**) As control, fresh untreated neutrophils were incubated in parallel during 4 h. Micrographs were originally captured at ×400 magnification (**a**,**f**) or ×600 magnification (**b**-**e**). Scale bars, (**a**,**f**) 5 µm; (**b**,**d**,**e**) 2µm.

.....

inflammatory stimuli induce NETosis and the release of neutrophil extracellular traps (NETs). NETs are released to the extracellular space by activated neutrophils, but additional studies are required to establish under what conditions NETs play an important role in bacterial killing. Importantly, some pathogens are able to overcome these bactericidal mechanisms^{14–18}.

In this study, we investigated the interaction of *A. baumannii* and *A. pittii* clinical isolates with professional phagocytes. Understanding the mechanisms by which *Acinetobacter* interacts with immune cells is a prerequisite for the development of new prophylactic or therapeutic agents to treat the infections caused by these bacteria. Therefore, the aim of this work was to clarify the mechanisms of host-microbe interaction between neutrophils and *Acinetobacter* with focus on phagocytosis and neutrophil extracellular traps release.

Results

Phagocytosis and clearance of *Acinetobacter* **strains by human neutrophils.** Human neutrophils are round cells that remain semi-attached and roll along the surfaces used in this study (glass or plastic). The presence of human (2%) or bovine serum (10%) in the protocol used to cultivate cells did not affect neutrophil behavior nor the outcome of the *in vitro* infections. The capability of neutrophils to bind and internalize *A. baumannii* and *A. pittii* is presented in Fig. 1. In presence of *Acinetobacter*, neutrophils can flatten and become phagocytic. The transition to active phagocytosis is sudden, with extension of the cell-bacteria contact area followed by the emergence of pseudopods to form a phagocytic arm that progresses to complete engulfment of the bacteria. Bacteria were associated with neutrophils as early as 30 min post-infection (Fig. 1a). Neutrophils were in contact with some of the surrounding bacteria through filopodia or pseudopods (arrow in Fig. 1b), and multiple attempts



Figure 2. Live/Dead staining in unfixed neutrophils. Neutrophils were infected with *Acinetobacter* strains, then exposed to components of the live/dead kit, propidium iodide and SYTO9. Upper panels: in merged images, live bacteria appear green, dead bacteria appear red and eukaryotic nuclei appear pink. Lower panels show selected z-stacks at high magnifications (red channel) of the boxed areas in the upper panel. Untreated similarly stained cells served as control (C). Original magnifications: upper panels ×400; lower panels ×1000. Scale bars, 5 µm.

at phagocytosis were observed at neutrophil surfaces. At this time, whole bacteria (indicated by red fluorescence) were observed inside human neutrophils (Fig. 1c). After 2 h, bacteria already remained largely inside neutrophils, but with different sizes and some loss of their characteristic red immunofluorescent pattern, indicating that the phagocytosed bacteria were probably being degraded (Fig. 1d,e). Morphology in control neutrophils remains unchanged (Fig. 1f).

Furthermore, a Live/Dead staining was used to examine survival of *Acinetobacter* spp. after phagocytosis by unfixed primary human neutrophils. The dyes were added in the presence of 0.1% saponin, which sequesters cholesterol to preferentially permeabilize host cell plasma membranes, not *Acinetobacter* membranes. All acinetobacters stain with SYTO9, but only bacteria with compromised membranes stain with propidium iodide. The propidium iodide overcomes the SYTO9 fluorescence, so live bacteria appear green and dead bacteria appear red. Intracellular dead bacteria increased over time during the infection period (Fig. 2). From 2 to 4 h post-infection bacteria attached to plastic or glass surfaces divided rapidly and neutrophils tried to contain the bacterial overgrowth by quickly and continuously engulfing these pathogens (Supplementary videos 1 and 2).

Interestingly, using scanning electron microscopy and immunofluorescence, we observed that human neutrophils used very large filopodia (more than $50 \,\mu$ m) to not only sense the environment, but also to detect and retain bacteria (Fig. 3). These large filopodia were also observed during experiments using live cell imaging on glass or plastic (Supplementary video 3).

Importantly, preincubation of neutrophils with actin-cytoskeleton inhibitor cytochalasin D abrogated phagocytosis of *Acinetobacter* strains. This was demonstrated by the presence of neutrophils without bacteria 3 h after infection (Supplementary Figure 1a,b). Of note, this cytoskeleton inhibitor reduces up to 90% of the number of neutrophils in the microscopic fields indicating that not only was phagocytosis affected, but also adherence of these cells to inert surfaces (the remained neutrophil morphology totally round).

Gentamicin protection assays also demonstrated that intracellular bacteria had died because no live bacteria were recovered 3 h after infections following gentamicin treatment (Supplementary Figure 1c). After performing quantitative CFUs counting experiments, difference in numbers between wells containing *Acinetobacter* and wells containing *Acinetobacter* plus neutrophils was not significative, despite neutrophils are able to eat at least 50 bacteria/cell (as observed by confocal microscopy) after 4 h of infection (Supplementary Figure 1d).

We incubated human neutrophils cells with extracellular products (ECPs) produced by all the *Acinetobacter* strains during growth in liquid medium, and no cytotoxicity was observed after 5 h of incubation with increasing volumes of bacterial ECPs (not shown).

Production of neutrophil extracellular traps. Neutrophils that had become engorged with microbes (some neutrophils were shown to harbour more than 50 bacteria) started to die after 3 h post infection (Fig. 4a,b). Neutrophils started to lose their individual nuclear lobules resulting in globular or horseshoe shape structures. During their final stage, nuclear and cytoplasmic integrity was lost, and most cells finally round up again and finally release NETs (Fig. 4c,d). Very occasionally, NETs form large aggregates (up to 1 mm in length) (Fig. 4e). In many cases, NETs clearly seems to entrap bacteria (Supplementary Figure 2a and Supplementary video 4). Immunofluorescence analyses confirmed the co-localization of histones (H3) and neutrophil elastase (NE) in extracellular traps released from human neutrophils (Supplementary Figure 2b,c). These NETs appear to be flexible, and to emerge from the cell from which they originated (Supplementary Figure 3a). The presence of NETs



Figure 3. Capture and phagocytosis of *Acinetobacter* by human neutrophils. Pictures show SEM microphotographs (**a,c,d,e**) or immunofluorescence (**b**) images of infected neutrophils (3 h, strain ATCC 19606^T). Large filopodia were observed in infected cultures in close contact with bacteria (**b,c**). Some of these filopodia completely surround two bacteria (asterisks in **c**) while pseudopods are catching bacteria attached to the inert surface (arrows in **c**). In (**b**) bacteria were detected with anti-*A. baumannii* rabbit antibody (red), actin cytoskeleton was labelled with Atto 488 phalloidin (green) and nuclei were stained with DAPI (blue). Unstimulated neutrophils show round shapes (**d**). (**e**) Detail of the boxed area in (**d**) Micrographs were originally captured at ×4000 (**a**), ×600 (**b**), ×10000 (**c**), ×500 (**d**) or ×9000 magnification (**e**). Scale bars, (**a**) 10 µm; (**b,c,e**) 5 µm; (**d**) 100 µm.

in infected cultures was highly variable. Non-infected neutrophils were used as controls for immunofluorescence staining in the nucleus (colocalization with histone H3) and cytoplasm (intracellular neutrophil elastase), and, as expected, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 infection used as positive control induced NET formation (Supplementary Figure 3b–d).

To quantify NETosis and NET release by *in vitro*-infected human neutrophils, neutrophil elastase and citrullinated histone H3 were measured by a NETosis assay and ELISA kit respectively. These assays demonstrated that *Acinetobacter* strains were able to induce the release of certain amounts of NETs by human neutrophils *in vitro* (Fig. 5a,b). However, NET release by infected neutrophils was always lower than neutrophils stimulated with the well known activator of full NETs release, PMA. To compare the induction of NETs by different strains,



Figure 4. NETs production by human neutrophils infected with *Acinetobacter*. Pictures show a SEM microphotograph (**a**) or immunofluorescence images (**b**-**e**) of neutrophils 4 h post-infection: (**a**,**c**-**e**) strain ATCC 19606^T; (**b**) strain HUMV 06-2790. From (**b** to **e**) bacteria were detected with anti-*A. baumannii* rabbit antibody (red), actin was labelled with Atto 488 phalloidin (green), and DNA was stained with DAPI (blue). Micrographs were originally captured at ×15000 (**a**), ×600 (**b**,**d**), ×400 (**c**) or ×200 magnification (**e**). Scale bars, (**a**-**d**) 5 µm; (**e**) 100 µm.

NETs formation was examined using the extracellular nucleic acid dye SYTOX Green by live-cell imaging during infections (Supplementary Figure 4). Furthermore, using a quantitative fluorescence assay, NETs formation by several strains was compared with untreated neutrophils and with neutrophils treated with PMA. Fluorescence from NETs in infected cultures with several *Acinetobacter* strains was also higher than in untreated neutrophils and lower that in PMA stimulated neutrophils. By this method, one strain (HUMV 06-2790) failed to clearly demonstrate NETs release (Fig. 5c).

Infection of macrophage-neutrophil co-cultures. To test whether host cell type contributed mostly to clearance of this pathogen, we performed infections of mixed cultures containing human neutrophils and differentiated macrophages. Incubation of *Acinetobacter* with macrophages and neutrophils did not induce an important phagocytosis in macrophages, although produced remarkable important cell activation (compared with untreated macrophages), as demonstrated by the elongated cell shape. After 3 h of infection, >90% of macrophages were in contact with 5 or less bacteria despite that *Acinetobacter* was largely occupying the glass surface. On the other hand, neutrophils were full of bacteria (Supplementary Figure 5).

Discussion

Neutrophils and macrophages are the first lines of defence against invading microbes. Neutrophils are terminally differentiated, rapidly reach the infection site, and are equipped with antimicrobial proteins to kill bacteria¹⁹. However, little is known about the relative contribution of neutrophils during the initial phase after encountering *Acinetobacter* spp. in human infections. Moreover, although several animal infection models were used to study the infection by *A. baumannii* (sepsis and lung infections), neutrophils from mammals and fish differ from human neutrophils in many ways^{20–22}. As the success of *A. baumannii* and *A. pittii* as pathogens depends on its ability to avoid killing by components of the innate immune system, the aim of the current study was to characterize the human neutrophil response to these microbes. When neutrophils were assessed for their inherent abilities to neutralize *Acinetobacter* strains, both bacterial species were recognized within 20–30 min of co-incubation with cells. Immunofluorescence staining and double-immunofluorescence performed from 30 min to 4 h demonstrated that neutrophils catch bacteria continuously. This was also confirmed by time-lapse microscopy. Moreover, we examined live and dead acinetobacters inside neutrophils by using confocal microscopy. The



Figure 5. Quantification of elastase, citrullinated histone H3 and extracellular DNA using SYTOX Green. (a) Measurement of released neutrophil elastase. Human neutrophils were infected with *Acinetobacter* strains or treated with PMA for four hours, washed, and treated with S7 nuclease for 15 min. The supernatant from each well was assayed. Samples were tested in triplicate. (b) Measurement of citrullinated histone H3 (CitH3). Human neutrophils were infected with *Acinetobacter* strains for 4 hours. Supernatants were centrifuged to remove cellular debris and then tested in the ELISA. Samples were tested in triplicate. The concentrations of total neutrophil elastase and CitH3 in the analyzed samples were estimated from standard curves obtained for each assay. (c) Quantification of fluorescence after infection experiments using SYTOX Green. Supernatants from unstained infected cultures were partially digested with DNAse I and stained with SYTOX Green. Each bar indicates the average of three independent experiments ± SD. Asterisks indicate: *p = 0.0004; **p < 0.00001; n.s., p = 0.1610.

primary goal of these experiments was to confirm whether the bacteria were located physically inside or outside the host cells and that dead bacteria inside cells lost their immunogenic surface (stained with a polyclonal antibody) because, although neutrophils kill the vast majority of bacteria, some microbes circumvent killing by these cells¹⁴⁻¹⁶. Using anti-Acinetobacter antibodies, whole bacteria were seen as red at the glass surface and associated with cells, but dead or damaged bacteria inside cells lost their characteristic red fluorescence. To unequivocally demonstrate that human neutrophils kill Acinetobacter, and therefore bacterial survival is compromised in presence of these cells, we performed an in situ Live/Dead staining on unfixed cells. This staining demonstrated that, once inside neutrophils, Acinetobacter die. This was observed along the experiments demonstrating that human neutrophils can easily and effectively kill both A. baumannii and A. pittii in vitro. In accordance with several authors, uptake of bacteria could lead to full activation of the anti-microbial arsenal of the neutrophil killing the ingested bacteria²³. In conclusion, our findings strongly indicate that all the strains tested were phagocytosed and killed by human neutrophils. This is clearly in contrast to reports by others^{24, 25}. Based on the experimental methods described in these previous publications, there is no obvious indication for the discrepancies in the reported results, apart from bacteria-cell contact time 1 h²⁶ vs 4h. According to our immunofluorescence, SEM, CFUs counting and live-cell and live/dead imaging experiments, neutrophils are in contact with Acinetobacter at 1 h, but further incubation time renders active phagocytosis. Our findings also correlate with current in vivo studies in mice and fish reporting the significance of neutrophils on Acinetobacter infections^{26–28}. Moreover, our results correlate well with in vitro models using human neutrophils against other microbes, where phagocytosis seems to be the main mechanism to clear bacteria^{10, 29}. Filopodia are abundant in macrophages³⁰, but little is

| n° | Species | Strain | Clinical source |
|----|--------------|---|-----------------------|
| 1 | A. baumannii | ^a ATCC [®] 19606 ^T | urine |
| 2 | A. baumannii | ^b HUMV 1319 | wound exudate |
| 3 | A. baumannii | HUMV 2471 | sputum |
| 4 | A. baumannii | HUMV 2790 | skin ulcer |
| 5 | A. baumannii | HUMV 3743 | wound exudate |
| 6 | A. pittii | °LMG 10559 | tracheal aspirate |
| 7 | A. pittii | HUMV 0315 | sputum |
| 8 | A. pittii | HUMV 4336 | diabetic foot exudate |
| 9 | A. pittii | HUMV 6207 | wound exudate |
| 10 | A. pittii | HUMV 5918 | wound exudate |
| 11 | A. pittii | HUMV 6483 | urine |

 Table 1. Acinetobacter strains used in this study. ^aATCC, American Type Culture Collection. ^bHUMV, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. ^cLMG, Culture Collection of the Laboratorium voor Microbiologie Gent.

known about their role during phagocytosis or chemotaxis in neutrophils. An unexpected finding of the study was the presence of very large filopodia emerging from the neutrophil body to sense the environment and even to catch bacteria *in vitro*. Although quantitation of the filopodial dynamics or the cytoskeletal reorganization during neutrophil chemotaxis or phagocytosis is beyond the scope of this paper, new knowledge through a deeper study on the modulation and regulation of these filopodia may prove helpful in understanding the pathogenesis of this and other bacteria.

After 3–4 h post-infection, neutrophils started to die in presence of growing acinetobacters. In our assays, both *Acinetobacter* species grow actively in cell culture media and large numbers of bacteria were achieved 4 h after infections. Despite these *in vitro* assays did not allow new neutrophils recruitment, cells are full of dead bacteria 4 h after infections as demonstrate by confocal microscopy and gentamycin protection assays. This could mean that neutrophils play an important role against *Acinetobacter in vivo*.

Neutrophil cell death is fundamentally divided into necrosis, apoptosis, autophagy and the newly recognized NETosis. NETosis is a complex process that occurs with dramatic changes in the morphology of the neutrophil that finally lead to cell death¹⁰. The release of NETs against *Acinetobacter* was identical when human neutrophils were seeded on glass or plastic, as well as when using human or bovine serum. NETs are able to trap bacteria, fungi, and parasites³¹, but the possibility that the microbes ensnared in NETs are alive is controversial³². In our hands, *A. baumannii* and *A. pittii* induce a moderate cell death during the first 2 h of infection and NETs release by human neutrophils started after 3 h, similar to those induced by *P. aeruginosa*.

One of the most widely used techniques to observe NET induction is confocal microscopy. This approach is very informative as to the presence or absence of NETs, but microscopy images did not allow quantification of NETs. In this work, quantification of neutrophil elastase and citrullinated histone H3 demonstrated a strain-dependent variation in the NETs induction. Using SYTOX Green to stain and to quantify extracellular DNA, one strain failed to induce significant amounts of DNA release as compared with untreated controls. However, neutrophil extracellular traps release after *Acinetobacter* infections correlates with the presence of specific NETosis markers such as neutrophil elastase and histone H3³³. Therefore, and in agreement with Naccache and Fernandes³³ the experimental approaches to investigate NET formation underscore the need for consensus on standardized experimental approaches in the NET field.

Our results show that some bacteria were entrapped by NETs, and therefore this neutrophil response to these pathogens could partially prevent dissemination during the infection. A recent study shows that there are no *ex vivo* NETs production in neutrophils isolated from *Acinetobacter baumannii* bacteremia³⁴. However, neither the presence of NETs *in vivo* was studied nor the neutrophil-*Acinetobacter* interactions *in vitro*.

Finally, using differentiated human macrophages in co-culture with neutrophils to study *Acinetobacter* host-microbe interactions, we show that neutrophils play a key role in controlling the infections caused by these bacteria. This is important because neutrophils make also an essential contribution in the recruitment and activation of macrophages during infections³⁵. Our results also correlate with those of others showing that neutrophils, but not macrophages, are crucially to control early steps during bacterial and fungal infections^{35,36}.

In this work, our first objective was to demonstrate phagocytosis and killing of these two important pathogens by human neutrophils as a defence mechanism, but the induction of NETs in a small number of human neutrophils could be also important to fight infection. As neutrophils are also responsible for tissue damage and inflammation during certain circumstances, an overactivation of these cells (i.e. excessive NETs release) could be detrimental to the host. Therefore, future detailed studies at the molecular level will help to decipher the mechanisms involved in the regulation of neutrophils in presence of *Acinetobacter* or other pathogens, both alone or in combination with other immune cells.

Methods

Bacterial strains and growth conditions. The nine *Acinetobacter* clinical isolates (*A. baumannii* n = 4; *A. pittii* n = 5) used in this work were all previously described³⁷. Reference strains *A. baumannii* ATCC 19606^T and *A. pittii* LMG 10559 were also included (Table 1). The strains were routinely cultured on blood agar (BA) plates, brain hearth infusion broth (BHIB) or Luria Bertani broth (LB) at 37 °C, and frozen at -80 °C with 20% glycerol.

As control for NETs induction, *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 was used³⁸. *P. aeruginosa* was cultured in LB at 37 °C.

Neutrophil isolation from whole human blood. All studies involving human samples were in accordance with international standards for research ethics and were approved by the local institutional review board (Hospital Universitario Marqués de Valdecilla). Neutrophils were isolated from whole venous blood obtained from healthy human volunteers after informed consent. The EasySepTM Direct Human Neutrophil enrichment kit (StemCell) was used, following the manufacturer's instructions. Briefly, $50 \,\mu$ L of EasySep[®] neutrophil enrichment cocktail, containing a mix of tetrameric antibody complexes produced from monoclonal antibodies directed against the cell surface antigens CD2, CD3, CD9, CD19, CD36, CD56 and magnetic particles were added per 1 mL of blood. The blood/antibody/bead solution was adjusted to a total volume of 50 mL with recommended media and placed into an Easy 50 magnet for 10 min at room temperature (RT). Unbound neutrophils were pipetted into a new tube and placed in the Easy 50 magnet before addition of new magnetic particles. This step was repeated once. Highly-pure unbound neutrophils were briefly centrifuged and resuspended in RPMI 1640 media plus 10% fetal bovine serum (FBS) or 2% human serum. Neutrophils were also separated from other leukocytes using dextran density gradient centrifugation and red blood cells lysis as described elsewhere³⁹. Neutrophils were isolated from samples from at least 14 donors and purity of neutrophil preparations was determined by morphology after staining of nuclei with NucBlue (Molecular Probes).

Phagocytosis experiments. Acinetobacter strains were cultured overnight in 10 ml BHIB or LB at 37 °C with shaking at 175 rpm. Neutrophils were infected with bacteria at a multiplicity of infection (MOI, bacterium: eukaryotic cell ratio) of ~100:1. The number of colony forming units (CFUs) inoculated per well was determined by serial dilution in phosphate buffered saline (PBS) and plating on BA and incubated for 24 h. The infected plates were centrifuged for 4 min at $200 \times g$ prior to the incubation to promote adherence of bacteria to cells and to synchronize infections. Infected cells were then incubated at 37 °C with 5% CO₂ for different times. For quantification of live bacteria (extracellular and intracellular), external non-adherent bacteria were removed by washing four times with PBS, and human cells were then disrupted by addition of 100 µl Triton X-100 (1% in PBS) per well. To determine if A. baumannii is able to survive inside neutrophils after phagocytosis, strain A. baumannii ATCC 19606^T was selected. The MIC of gentamicin for this strain was previously determined³⁷. Cells were infected for 2 h, washed with PBS, and the culture medium was replaced by medium containing $200 \,\mu g \,ml^{-1}$ of gentamicin (Gibco). Cells were incubated for a further 2 h, and lysed as described before. After this time, number of putative viable intracellular bacteria was counted. To do this, serial dilutions of the disrupted mixture were plated onto BA and incubated for 48 h at 37 °C. Growth of 3 Acinetobacter strains in presence or absence of neutrophils was monitored during 4h. Viability/growth of Acinetobacter was calculated as the average of the total number of CFUs per total initial inoculum and expressed as a percentage. Quantitative phagocytosis experiments and growth experiments were repeated at least four times.

Incubation with cytochalasin D. Neutrophils were incubated with the actin-cytoskeleton inhibitor cytochalasin D ($5\mu g m l^{-1}$) (Sigma) for 30 min before the bacteria were added. Neutrophils were then infected for 3 h as described for the immunofluorescence assays.

Immunofluorescence assays. Cells were placed in 24-well tissue culture plates containing round glass coverslips. Bacteria were cultured as described above. Infected monolayers were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for different times (from 30 min up to 4 h). Cells were washed four times and fixed with cold paraformaldehyde (3.2% in PBS) for 20 min at room temperature. Then, cells were permeabilized with Triton X-100 (0.1% in PBS) for 5 min at RT and washed five times with PBS. Atto-488 phalloidin (Sigma), which binds polymerized F-actin, was used to identify actin filaments and fibers. Differential double immunofluorescent labelling of Acinetobacter allowed extracellular bacteria to be differentiated from intracellular bacteria. For double immunofluorescence assays, strains A. baumannii ATCC 19606^T and A. pittii LMG 10559 were used to produce polyclonal sera as previously described⁴⁰. Antiserum was collected 8 weeks after the first boost, processed and stored using standard protocols⁴⁰. Histones in NETs were stained with a rabbit polyclonal anti-histone H3 antibody (Abcam). Specific human neutrophil elastase was stained with an anti-neutrophil elastase rabbit monoclonal antibody (Abcam). Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 594 or Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG were purchased from Invitrogen. After infections, coverslips were mounted on glass slides with Fluoroshield mounting medium containing DAPI (Sigma Aldrich) to stain double-stranded DNA. All preparations were examined with a Nikon A1R confocal scanning laser microscope equipped with 403 nm, 488 nm and 561 nm lasers. Images were captured at random with a ×20 Plan-Apo 0.75 NA, ×40 Plan-Fluor 1.3 NA or ×100 Apo-TIRF 1.49 NA objectives, and processed using the NIS-Elements 3.2 software. All immunofluorescence experiments for each strain were repeated with neutrophils from at least three different blood samples.

Assessing Bacterial Viability inside neutrophils with Live/Dead staining. Bacterial viability inside neutrophils was determined by using the BacLight Live/Dead bacterial viability kit (Molecular Probes Inc.). Live/Dead Staining was performed in presence of 0.1% saponin for 20 min at 1 h, 2 h, 3 h and 4 h post-infection. A series of optical sections was obtained with a Nikon A1R confocal scanning laser microscope (CLSM); the excitation wavelengths were 488 nm (green) and 561 nm (red), and 500- to 550-nm and 570- to 620 nm emission filters were used, respectively. Images were captured at random with a 100× Apo TIRF (numerical aperture [NA], 1.49) objective. Reconstructions of confocal sections were assembled using NIS-Elements software, version 3.2.

Time-lapse fluorescence microscopy. Time-lapse microscopy was carried out on a Nikon Eclipse Ti-E microscope (Nikon), equipped with a PlanFluor $20-40 \times 0.6$ NA objective (Nikon) and a CO₂ incubator.

Neutrophils cells were seeded in 6-well plates (Nunc), in coated 4-well μ -slides (Ibidi, Martinsried, Germany) or in 24-well plates containing coverslips and infected as described before. NucBlue (one drop/well, Molecular Probes) or 10 μ M SYTOX Green were added to each well to stain nuclei. Cells were infected as described before, and images were collected from 30 min up to 120 min post-infection every 2 min (NucBlue) or from 40 min up to 190 min post-infection every 1.5 min (SYTOX Green) with an ORCA- R2 CCD camera (Hamamatsu) powered by Nis Elements 3.2 software. For NucBlue, a 375–390 nm excitation, 420–490 nm emission filter was used and for SYTOX Green, a 485–520 nm excitation, 521/25 nm emission filter was used. Individual time-lapse frames were imported to the open source image analysis software, ImageJ (http://rsbweb.nih.gov/ij).

NETosis assay. In separate experiments, we used a NETosis assay kit (Cayman Chemical) to determine the activity of NET-bound neutrophil elastase, according to manufacturer's instructions. The assay is based on the enzymatic activity of neutrophil elastase in the culture medium that has been released from NETs through the action of S7 Nuclease. A colorimetric assay employing a specific elastase substrate (N-methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide) was used after washing away non-NET associated elastase, as to measure only NET-associated elastase activity. The 5 substrate is selectively cleaved by elastase to give a 4-nitroaniline product that absorbs light at 405 nm. The concentration of neutrophil elastase was measured by optical densitometry in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher).

Citrullinated Histone H3 assay. Quantitative determination of citrullinated histone was made using an ELISA Kit (citrullinated histone H3 ELISA kit, Cayman Chemical) according to manufacturer's instructions. The concentration of citrullinated H3 was measured by optical densitometry at 450 nm in a Multiskan FC microplate reader (Thermo Fisher).

Quantification of NET-DNA. Neutrophils were left untreated, treated with PMA (100 nM) or infected with *Acinetobacter* strains for 4 h. Wells containing infected cultures and controls were then treated with DNAse I (Sigma Aldrich) for 15 min at RT. The reaction was stopped with 0.5 M EDTA and cultures were centrifuged for 10 min at 8,000 × g. 150 µl supernatants from each well were transferred in triplicate into black 96-well plates (Thermo ScientificTM). SYTOX Green was added (10 µM) to each well for 15 min and then fluorescence was quantified with excitation/emission wavelengths of 485/535 nm using a SynergyTM HTX Multi-Mode Microplate Reader (Biotek). All data were derived from three independent experiments. Statistical analysis of the data was carried out with the paired two-tailed Student t-test. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Cytotoxicity of bacterial extracellular products. To determine the cytotoxic potential of the ECPs present in *Acinetobacter* culture supernatants, bacteria were grown on LB or BHIB for 24 h and collected by centrifugation at 3,000 rpm for 15 min at RT. The supernatants were sterilized via membrane filtration (0.22 μ m, Millipore) and used immediately to challenge human neutrophils plated at density of 2 × 10⁴ cells/well. ECPs were added directly to the cell culture medium at different volumes (100–300 μ l, each in duplicate) and cells were incubated for periods up to 24 h and processed for immunofluorescence. Control cultures were incubated with the same volumes using fresh bacterial culture medium.

Scanning Electron Microscopy. Coverslips containing infected neutrophils were fixed in ice-cold 3% glutaraldehyde for 20 min at 4 °C. Samples were dehydrated with a graded ethanol series, dried by the critical point method, coated with gold in a Fine coat ion sputter JFC-1100 226 (JEOL, Ltd), and observed with an Inspect S microscope (FEI Company) working at 25 kV.

Isolation and differentiation of macrophages from human blood. Human monocyte-derived macrophages (HMDM) were isolated from the peripheral blood of healthy donors as previously described. Briefly, blood was layered at a ratio of 2:1 (blood/Ficoll medium) on Ficoll Histopaque-1077 (Sigma) in 15 ml centrifuge tubes and spun for 30 min at 2000 rpm in an Allegra X-22R centrifuge (Beckman Coulter). The layer containing the peripheral blood mononuclear cells was collected and then resuspended in 15 ml of PBS, and recentrifuged for 10 min at 1000 rpm. After two washes in PBS, cells were resuspended in DMEM containing 10% FBS, L-Glutamine and 100 units ml⁻¹ penicillin and 100 mg ml⁻¹ streptomycin on 12 mm diameter coverslips in 24-well plates. Non-adherent cells were removed after 4 h. The cells were subsequently cultured in cell culture medium containing 50 ng ml⁻¹ granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (Sigma Aldrich) in an atmosphere containing 5% CO₂. Cultures were fed daily, and infection experiments were performed 10 days after the peripheral blood was collected. Infections were performed with MOI of 100:1:1 (bacteria/neutrophil/ macrophage) ratio.

References

- 1. Clark, N. M., Zhanel, G. G. & Lynch, J. P. 3rd. Emergence of antimicrobial resistance among *Acinetobacter* species: a global threat. *Curr Opin Crit Care* 22, 491–499 (2016).
- 2. Lahmer, T. et al. Acinetobacter baumannii sepsis is fatal in medical intensive care unit patients: six cases and review of literature. Anaesth Intensive Care 42, 666–668 (2014).
- 3. Greene, C., Vadlamudi, G., Newton, D., Foxman, B. & Xi, C. The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Am J Infect Control* **44**, e65–71 (2016).
- 4. Espinal, P., Marti, S. & Vila, J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect* **80**, 56–60 (2012).
- Vila-Farres, X. et al. In vitro activity of several antimicrobial peptides against colistin-susceptible and colistin-resistant Acinetobacter baumannii. Clin Microbiol Infect 18, 383–387 (2012).
- Antunes, L. C., Imperi, F., Minandri, F. & Visca, P. In vitro and in vivo antimicrobial activities of gallium nitrate against multidrugresistant Acinetobacter baumannii. Antimicrobial agents and chemotherapy 56, 5961–5970 (2012).

- 7. Yamamoto, M. *et al.* Regional dissemination of *Acinetobacter* species harbouring metallo-beta-lactamase genes in Japan. *Clin Microbiol Infect* **19**, 729–736 (2013).
- 8. Pagano, M. et al. Emergence of NDM-1-producing Acinetobacter pittii in Brazil. Int J Antimicrob Agents 45, 444-445 (2015).
- 9. Kamolvit, W., Derrington, P., Paterson, D. L. & Sidjabat, H. E. A case of IMP-4-, OXA-421-, OXA-96-, and CARB-2-producing *Acinetobacter pittii* sequence type 119 in Australia. *J Clin Microbiol* **53**, 727–730 (2015).
- 10. Fuchs, T. A. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J Cell Biol 176, 231–241 (2007).
- 11. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. Nat Rev Microbiol 5, 577–582 (2007).
- 12. Standish, A. J. & Weiser, J. N. Human neutrophils kill Streptococcus pneumoniae via serine proteases. J Immunol 183, 2602–2609 (2009).
- 13. Kumar, V. & Sharma, A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. Int Immunopharmacol 10, 1325–1334 (2010).
- Greenlee-Wacker, M., DeLeo, F. R. & Nauseef, W. M. How methicillin-resistant Staphylococcus aureus evade neutrophil killing. Curr Opin Hematol 22, 30–35 (2015).
- Voyich, J. M. et al. Insights into mechanisms used by Staphylococcus aureus to avoid destruction by human neutrophils. J Immunol 175, 3907–3919 (2005).
- 16. Johnson, M. B. & Criss, A. K. Resistance of Neisseria gonorrhoeae to neutrophils. Front Microbiol 2, 77 (2011).
- Kobayashi, S. D. et al. Phagocytosis and Killing of Carbapenem-Resistant ST258 Klebsiella pneumoniae by Human Neutrophils. J Infect Dis 213, 1615–1622 (2016).
- Silva, M. T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. J Leukoc Biol 87, 93–106 (2010).
- 19. Kaufmann, S. H. & Dorhoi, A. Molecular Determinants in Phagocyte-Bacteria Interactions. Immunity 44, 476-491 (2016).
- 20. Rosen, H. Editorial: of mice and men-yet again. J Leukoc Biol 94, 210-212 (2013).
- 21. Mestas, J. & Hughes, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. J Immunol 172, 2731–2738 (2004).
- Bhuiyan, M. S. et al. Acinetobacter baumannii phenylacetic acid metabolism influences infection outcome through a direct effect on neutrophil chemotaxis. Proc Natl Acad Sci USA 113, 9599–9604 (2016).
- 23. Nordenfelt, P. & Tapper, H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. J Leukoc Biol 90, 271–284 (2011).
- Kamoshida, G. *et al. Acinetobacter baumannii* escape from neutrophil extracellular traps (NETs). *J Infect Chemother* 21, 43–49 (2015).
 Kamoshida, G. *et al.* A novel bacterial transport mechanism of *Acinetobacter baumannii* via activated human neutrophils through interleukin-8. *J Leukoc Biol* 100, 1405–1412 (2016).
- 26. Breslow, J. M. et al. Innate immune responses to systemic Acinetobacter baumannii infection in mice: neutrophils, but not interleukin-17, mediate host resistance. Infect Immun **79**, 3317–3327 (2011).
- van Faassen, H. et al. Neutrophils play an important role in host resistance to respiratory infection with Acinetobacter baumannii in mice. Infect Immun 75, 5597–5608 (2007).
- 28. Guo, B. et al. Quantitative impact of neutrophils on bacterial clearance in a murine pneumonia model. Antimicrobial agents and chemotherapy 55, 4601-4605 (2011).
- Surewaard, B. G. et al. Staphylococcal alpha-phenol soluble modulins contribute to neutrophil lysis after phagocytosis. Cell Microbiol 15, 1427–1437 (2013).
- Kress, H. et al. Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. Proc Natl Acad Sci USA 104, 11633–11638 (2007).
- 31. Lu, T., Kobayashi, S. D., Quinn, M. T. & Deleo, F. R. A NET Outcome. Front Immunol 3, 365 (2012).
- 32. Menegazzi, R., Decleva, E. & Dri, P. Killing by neutrophil extracellular traps: fact or folklore? Blood 119, 1214–1216 (2016).
- Naccache, P. H. & Fernandes, M. J. Challenges in the characterization of neutrophil extracellular traps: The truth is in the details. European journal of immunology 46, 52–55 (2016).
- 34. Konstantinidis, T. et al. Immunomodulatory Role of Clarithromycin in Acinetobacter baumannii Infection via Formation of Neutrophil Extracellular Traps. Antimicrobial agents and chemotherapy 60, 1040-1048 (2015).
- Chertov, O. et al. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. J Exp Med 186, 739–747 (1997).
- Mircescu, M. M., Lipuma, L., van Rooijen, N., Pamer, E. G. & Hohl, T. M. Essential role for neutrophils but not alveolar macrophages at early time points following *Aspergillus fumigatus* infection. J Infect Dis 200, 647–656 (2009).
- Lazaro-Diez, M. et al. Acinetobacter baumannii and A. pittii clinical isolates lack adherence and cytotoxicity to lung epithelial cells in vitro. Microbes Infect 18, 559–564 (2016).
- Ocampo-Sosa, A. A. et al. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. Antimicrobial agents and chemotherapy 56, 1703–1713 (2012).
- Kuhns, D. B., Long Priel, D. A., Chu, J. & Zarember, K. A. Isolation and Functional Analysis of Human Neutrophils. Curr Protoc Immunol 111(7.23), 21–16 (2015).
- 40. Ramos-Vivas, J. et al. Rhodococcus equi human clinical isolates enter and survive within human alveolar epithelial cells. Microbes Infect 13, 438–446 (2011).

Acknowledgements

M.L.-D. holds a contract from the Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla IDIVAL and Universidad de Cantabria (PREVAL16/05). S.R.-S. holds a contract from the Instituto de Investigación Valdecilla IDIVAL. J.R.-V. holds a Miguel Servet II contract for Young Researchers from the Instituto de Salud Carlos III, Spain. The authors thank Dr. Fidel Madrazo (Electron Microscopy Unit, Technology Support Services, IDIVAL) for helping with confocal microscopy and live cell imaging. J.R.-V. acknowledges the receipt of a Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) fellowship. J.R.-V. thanks Inés Montes and Adrián Fernández for technical assistance. J.R.-V. was supported by the Spanish Instituto de Salud Carlos III, Spain (grants PI13/01310 and PI16/01103). Research in our laboratories is supported by Plan Nacional de I+D+i 2008–2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) - co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author Contributions

J.R.V. conceived the experiments, J.R.V. and D.S.S. designed the experiments, M.L.D., I.C.G., S.R.S., C.L., D.M., F.A., A.O.S., J.M.I. and J.R.V. performed the experiments, M.L.D., I.C.G., J.N., F.A., J.M.I., L.M.M. and J.R.V. analyzed the data, A.O.S., D.S.S., J.N., F.A., J.M.I. contributed with reagents/materials/analysis tools, J.R.V. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-04870-8

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

Human neutrophils phagocytose and kill Acinetobacter baumannii and A. pittii

María Lázaro-Díez, Itziar Chapartegui-González, Santiago Redondo-Salvo, Chike Leigh, David Merino, David San Segundo, Jesús Navas, José Manuel Icardo, Félix Acosta, Alain Ocampo-Sosa, Luis Martínez-Martínez and José Ramos-Vivas

Supplementary Figure 1. Cytochalasin and gentamicin treatments

Effects of pretreatment of human neutrophils with cytochalasin D (**a,b**). Neutrophils were infected with *A. baumannii* strain ATCC 19606^T for 3 h. Bacteria were detected with anti-*A. baumannii* rabbit antibody (red) and nuclei were stained with DAPI (blue). In merged images, actin cytoskeleton was detected with Atto 488 phalloidin (green). Micrograph was originally captured at ×400 magnification. Scale bars, 5 μ m. c) Effects of the addition of gentamicin on bacterial survival in presence of neutrophils. Two hours after infections (MOI of 100:1), gentamicin was added. After 2 h post-treatment, the exact number of bacterial CFUs (as a percentage of the initial inoculum) was determined. Values represent means ± standard deviations from three independent experiments. G: gentamicin. d) Growth of *Acinetobacter* strains in presence or absence of neutrophils was monitored during 4 h. Viability/growth of *Acinetobacter* was calculated as the average of the total number of CFUs per total initial inoculum and expressed as a percentage. Black bars, *Acinetobacter* plus neutrophils; grey bars, *Acinetobacter* alone. Values represent means ± standard deviations from three independent experiments.

Supplementary Figure 2. Traps colocalization with histone H3 and elastase.

a) NETs (blue) colocalize with *Acinetobacter pittii* strain LMG-10559 (red). Immunofluorescence analyses confirmed the colocalization of histones (H3) (**b**) and neutrophil elastase (NE) (**c**) with DNA in extracellular traps released from human neutrophils. **b**, (from left to right) neutrophil elastase (green channel), DAPI (blue channel), and merged images. **c**, (from left to right) histone H3 (green), DAPI (blue) and merged images. Original magnification, **a**, ×600; **b**, **c** ×400. Scale bars: 5 μ m.

Supplementary Figure 3.

NETs emerge from the cell from which they originated. Human neutrophils infected for 4 h with *A. pittii* strain HUMV 08-0315 (**a**). Bacteria were detected with anti-*A. baumannii* rabbit antibody (red), DNA was stained with DAPI (blue) and actin cytoskeleton was detected with Atto 488 phalloidin (green). (**b**, **c**) Control for antibody specificity in untreated neutrophils: anti-histone H3 (green) and nucleus (blue) (**b**); anti-neutrophil elastase (red), actin (green) and nucleus (blue) (**c**). NETs induced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (**d**), where bacteria were detected with anti-*P. aeruginosa* antibody (red), DNA was stained with DAPI (blue) and actin cytoskeleton was detected with Atto 488 phalloidin (green). Original magnifications, **a**, ×400; **b**,**c** ×600; **d**, ×400. Scale bars: **a**,**c**, 10 µm; **b**,**d**, 5 µm.

Supplementary Figure 4.

Live-cell experiments were performed in presence of SYTOX Green. Screenshots were taken from 40 min post- infection (time 0h) up to 190 min post-infection (time 4h). From left to right, untreated neutrophils, neutrophils infected with *Acinetobacter* and neutrophils treated with PMA.

Supplementary Figure 5. Infection of co-cultures of human neutrophils and macrophages. Co-cultures were infected for 3 h with *A. baumannii* strain ATCC 19606^T (**a-a**') or *A. pittii* LMG 10559 (**b-b**'). After infections, cells were fixed and processed for immunofluorescence labeling and confocal microscopy. The image shows maximal projections where bacteria were detected with anti-*Acinetobacter* rabbit antibodies (red), actin cytoskeleton was labeled with Atto 488 phalloidin (green) and nuclei were stained with DAPI (blue). Arrows indicate macrophages and asterisks indicate neutrophils (**a,b**) or their location (**a',b'**). Untreated differentiated human macrophages were included for shape comparison (C). Micrographs were originally captured at ×400 magnification. Scale bars, a-b', 10 µm; C, 20 µm.

Supplementary videos 1 and 2.

Time-lapse microscopy showing active phagocytosis of *Acinetobacter* by human neutrophils. NucBlue (DNA) *ex vivo* staining was applied to show the multi-lobulated neutrophil nuclei. The video was recorded between 2 h and 3 h post infection.

Supplementary video 3.

Time-lapse microscopy of untreated neutrophils showing large filopodia.

Supplementary video 4.

Human neutrophils infected for 4 h with *A. baumannii* strain HUMV 07-1319. NETs emerge from the cell from which they originated to entrap bacteria. Bacteria were detected with anti-*A. baumannii* rabbit antibody (red), DNA was stained with DAPI (blue) and actin cytoskeleton was detected with Atto 488 phalloidin (green).

Supplementary Figure 1









