

La tesi d'Ana Mena analitza els mecanismes d'adaptació de *Pseudomonas aeruginosa* a les vies respiratòries dels malalts de fibrosi quística

El treball *Efecto de la hipermutación sobre la adaptación genética, persistencia y virulencia en la infección respiratoria crónica por Pseudomonas aeruginosa en pacientes con fibrosis quística*, defensat a la Universitat de les Illes Balears, amplia el coneixement de l'efecte que la hipermutació provoca en la virulència, l'eficàcia biològica i la persistència o adaptació de la *Pseudomonas aeruginosa* en la infecció pulmonar crònica en el context de la fibrosi quística

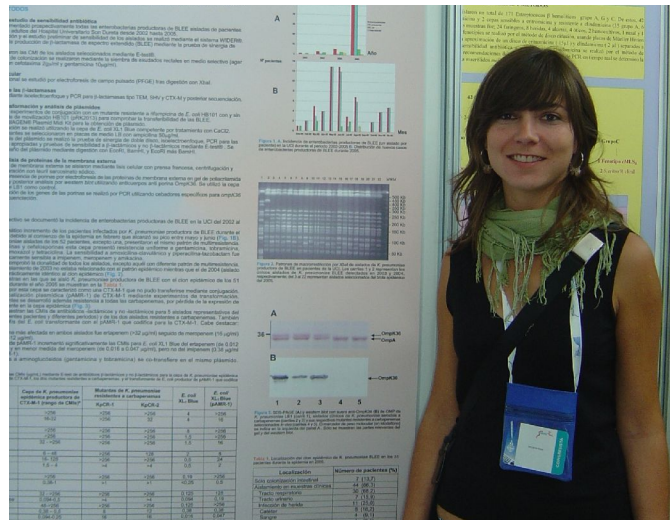
Palma. Desembre de 2010

El principal responsable de les infeccions respiratòries cròniques és la *Pseudomonas aeruginosa*. És un bacteri oportunista que ataca els individus immunodeprimits, especialment els malalts hospitalitzats, per la qual cosa és una de les causes principals d'infecció hospitalària. Aquest microorganisme es caracteritza per la seva elevada resistència als antibiòtics, la qual cosa el converteix en un perill important. De fet, és la principal causa de mortalitat entre els pacients afectats de fibrosi quística.

La gran resistència que presenta la *P. aeruginosa* als antibiòtics té l'origen en el caràcter hipermutador d'aquest bacteri, és a dir, en la capacitat de modificar les seves característiques genètiques molt per damunt de la mitjana. Aquest tret facilita l'adaptació a nous ambients o a condicions adverses i també el desenvolupament de resistència als antimicrobians emprats per combatre'l. La tesi d'Ana Mena Ribas, defensada a la Universitat de les Illes Balears, analitza els mecanismes que la *P. aeruginosa* fa servir per adaptar-se al sistema respiratori de les persones afectades de fibrosi quística. En concret, la recerca ha ampliat el coneixement de l'efecte que la hipermutació provoca en la virulència, l'eficàcia biològica (*fitness*), la persistència o adaptació d'aquest bacteri en la infecció pulmonar crònica en el context de la fibrosi quística.

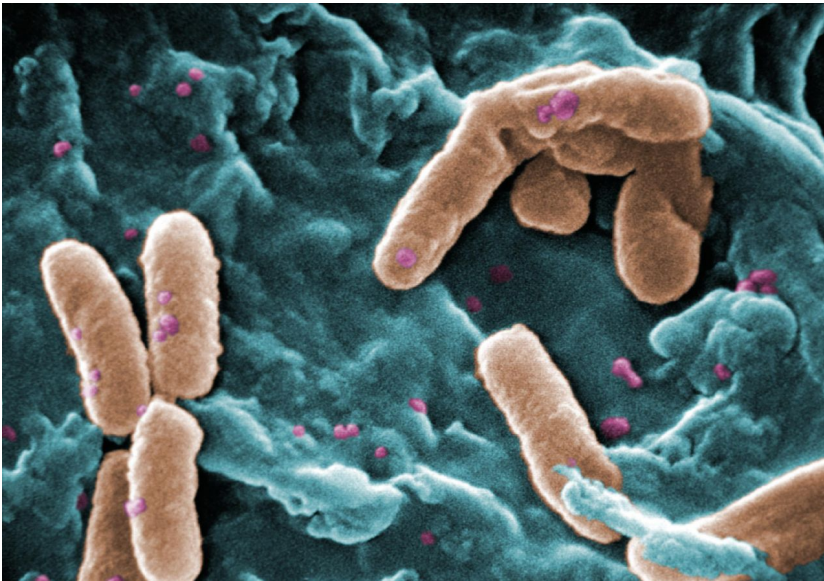
P. aeruginosa i hipermutació

En els darrers anys s'han produït nombrosos avenços en el coneixement dels canvis que experimenten els bacteris durant la seva adaptació als éssers humans per causar-hi infecció, com també dels factors que poden influir en la seva adaptació. La infecció respiratòria crònica (IRC) per *P. aeruginosa* en pacients amb fibrosi quística és un dels exemples més il·lustratius de l'evolució natural bacteriana extrema en el curs de les infeccions en l'ésser humà. El sistema Mismatch Repair (MMR) és el que amb més freqüència es troba relacionat amb l'aparició de ceps hipermutadors de *P. aeruginosa* en la infecció pulmonar crònica. Se n'ha detectat un percentatge elevat en aquest tipus de pacients, al contrari del que passa en els processos aguts, en els quals la prevalença del fenotipus hipermutador és molt baixa.



La investigadora Ana Mena Ribas, autora de la tesi.

La tesi d'Ana Mena analitza els mecanismes
d'adaptació de *Pseudomonas aeruginosa* a les
vies respiratòries dels malalts de fibrosi quística



*Micrografia electrònica
d'escombrat de bacteri
Pseudomonas aeruginosa,
associada amb freqüència a les
infeccions pulmonars greus que
compliquen la fibrosi quística.*

Encara que la relació entre la hipermutació i el desenvolupament de la resistència antimicrobiana ha estat demostrada clarament, encara no existeix una evidència clara de la relació entre la hipermutació i la virulència i la hipermutació i l'adaptació genètica o la persistència. En aquest sentit, la tesi d'Ana Mena aporta nous coneixements sobre el paper que fa la hipermutació i, més concretament, els mutants deficients al sistema MMR, sobre la patogènesi i l'adaptació bacteriana. També aporta novetats per comprendre el complex procés evolutiu que es produeix en les poblacions bacterianes quan causen infecció crònica.

Amb aquest objectiu, es realitzà un primer treball en què s'empraren els ceps PAO1, cep de referència de *P. aeruginosa*, i el seu derivat deficient en el sistema MMR, PAO Δ mutS, sols i en comparació tant in vitro com en dos models murins d'infecció aguda: sistemàtica i respiratòria. S'analitzà la mortalitat als 7 dies per cada cep i es determinà la ràtio PAO Δ mutS/PAO1 (índex de competició, IC) a la melsa i als pulmons per les infeccions sistemàtica i respiratòria, respectivament. Finalment, es realitzà un model de colonització orofaríngia en ratolins amb fibrosi quística i controls de tipus salvatge (*wild-type*), prenent frotis orofaríngis durant 24 setmanes per determinar-ne l'IC.

D'altra banda, en un treball previ publicat l'any 2006 a la prestigiosa revista *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (E.E. Smith *et al*, PNAS, 2006) es demostrà que la *P. aeruginosa* pateix una intensa adaptació genètica durant el desenvolupament de la insuficiència renal crònica (IRC) en els pacients que pateixen fibrosi quística. Per a la tesi, s'utilitzà la mateixa col·lecció de ceps per estudiar l'efecte de la hipermutació en el procés d'adaptació. En la segona part d'aquest treball, per tant, es varen estudiar un total de 90 aïllats obtinguts a partir de 29 pacients diferents (pacients 2 a 30). S'establí el nombre de mutacions acumulades per any d'infecció per cada aïllat a partir de 34 gens seqüenciats en l'estudi previ. També es va analitzar una col·lecció de 35 aïllats obtinguts del pacient 1. El primer aïllat obtingut (als sis mesos d'edat) i el darrer (als 96 mesos) varen ser seqüenciats totalment en el treball anterior, i les mutacions detectades es varen traçar en els aïllats intermedis.

Els ceps hipermutadors es varen caracteritzar mitjançant la determinació de les seves freqüències de mutació i mitjançant estudis de complementació amb els gens de tipus salvatge mutS i mutL del sistema MMR. Els gens mutS i mutL dels ceps hipermutadors varen ser amplificats per PCR i completament seqüenciats per ser analitzats.



Els resultats obtinguts en aquesta recerca amplien el coneixement sobre l'efecte que la hipermutació provoca en la virulència, l'eficàcia biològica i la persistència o adaptació de la *P. aeruginosa* en la infecció pulmonar crònica en el context de la fibrosi quística. D'aquesta manera, es va poder observar que la inactivació del principal sistema implicat en la hipermutació, el sistema MMR, en la *P. aeruginosa* redueix la virulència en les infeccions agudes, redueix l'eficàcia biològica, tant *in vitro* com *in vivo*, i disminueix, per tant, la transmissibilitat. A més, disminueix el potencial de colonització orofaríngia inicial. D'altra banda, afavoreix la persistència a llarg termini de la colonització orofaríngia a la fibrosi quística. Els resultats de la recerca d'Ana Mena ajuden a entendre el perquè de l'alta i la baixa prevalença dels ceps hipermutadors de *P. aeruginosa* en les infeccions cròniques i agudes, respectivament.

A més, els resultats obtinguts en la segona part del treball demostren que la hipermutació actua com un catalitzador en l'acumulació de mutacions adaptatives i afavoreix, per tant, l'adaptació genètica al pulmó afectat de fibrosi quística.

Referència de la tesi

Títol: Efecto de la hipermutación sobre la adaptación genética, persistencia y virulencia en la infección respiratoria crónica por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística

Autor: Ana Mena Ribas

Àrea de coneixement: Microbiologia

Departament: Biologia

Director: Antoni Oliver Palomo

Qualificació: Excel·lent cum laude

Membres del tribunal

President

Dr. Fernando Baquero Mochales
Servei de Microbiologia
Hospital Ramon y Cajal (Madrid)

Secretari

Dr. Rafel Bosch Zaragoza
Departament de Biologia
Universitat de les Illes Balears

Vocals

Dr. Jordi Lalucat Jo
Departament de Biologia
Universitat de les Illes Balears

Dr. José Luis Martínez Menéndez
Departament de Biotecnologia Microbiana
Centre Nacional de Biotecnologia (CSIC)

Dr. Jesús Blázquez Gómez
Departament de Biotecnologia Microbiana
Centre Nacional de Biotecnologia (CSIC)

Publicacions relacionadas

Mena, A., Macià, M. D., Borrell, N., Moya, B., De Francisco, T., Pérez, J. L., Oliver, A. (2007) «Inactivation of the mismatch repair system in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates virulence but favors persistence of oropharyngeal colonization in cystic fibrosis mice». *Journal of Bacteriology*, 189(9), pàg. 3665-3668. DOI: 10.1128/JB.00120-07.

Mena, A., Smith, E. E., Burns, J. L., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Perez, J. L., Oliver, A. (2008) «Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation». *Journal of Bacteriology*, 190(24), pàg. 7910-7917. DOI:10.1128/JB.01147-08