

# **Interacción de *Pseudomonas aeruginosa* con células epiteliales: caracterización de las células apoptóticas a las que se adhiere y estudio del mecanismo de internalización y destino intracelular**

Tesis para optar por el título de Doctora en Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad de San Martín

**Autora:** María Victoria Pepe

**Directora:** Dra. Arlinet Kierbel

Marzo 2020

## Agradecimientos

Con la escritura de los agradecimientos, doy por terminada la elaboración de este manuscrito, el cual es el compilado de un proyecto que se extendió por más de media década. Dicho proyecto, no solo incluye mi formación profesional como científica, sino también mi formación como individuo y como compañera dentro de mi grupo. Dicha formación es muy valiosa, ya que la ciencia se nutre con el compañerismo y la colaboración.

Todo el camino andado hasta acá fue emocionante, movilizador y vertiginoso, y por más que hoy culmina una etapa, el camino no termina, sino que se ensancha y se pierde en el horizonte, y espero siempre tener fuerzas para recorrerlo.

Ningún camino se recorre en soledad, y si bien soy yo la que me doctoro, el logro que eso implica se debe a la colaboración de muchas personas, a las cuales hoy quiero agradecer.

Agradezco a las personas que forman y formaron parte de mi grupo de trabajo. Le doy las gracias a mi directora, la Dra. Arlinet Kierbel, quien, no sólo me permitió unirme a su equipo, sino que también me acompañó a lo largo de toda mi carrera, no solo intelectual sino también emocionalmente. Hoy crecí como persona, y mucho de lo que logré en este tiempo se lo debo a ella.

Les agradezco a mis compañeras, todas ellas lograron que mi paso por nuestra mesada sea mucho más que una obligación profesional. Quería agradecerle a Adriana por su ayuda incondicional y su buena onda. Les doy las gracias a Paula y a Camila, quienes con su amor y simpatía alegraron mis días. Quiero decirles que el regalo de su amistad es una de las cosas que más valoro y que, en los momentos más difíciles fue el motor que me impulsó para seguir andando.

También quiero agradecer a todas las personas del instituto que, de una forma o de otra, me brindaron su ayuda cuando la necesité. Desde el préstamo de una placa de cultivo hasta una charla alentadora en la cocina, todos esos detalles hacen que me sienta agradecida por las personas que me rodean y por el lugar en donde estoy. Muchas gracias

Por otro lado, quería agradecer a las personas que, si bien no estuvieron conmigo laboralmente, estuvieron presentes en cada momento, ya que su afecto siempre me acompaña.

Quiero agradecerle a mi mamá, mi papá y mi hermana. Ellos siempre estuvieron y siempre van a estar y no podría pedirle a la vida una familia mejor. Una parte muy grande de este logro se lo debo a ellos.

Le dedico un agradecimiento muy especial a Marcos, el amor de mi vida, quien siempre estuvo conmigo a lo largo de este camino y cuyo amor me impulsa siempre a seguir para adelante.

Me gustaría agradecer también a todos mis amigos. Quería decirle gracias a Dani, Fede, Gime y Diego. Su amistad siempre me acompaña y me alegra, estoy muy feliz de tenerlos en mi vida. Agradezco también a Cata y Facu, mis pequeños “sobri-amigos”, quienes son muy especiales para mí. También quiero decirle gracias al grupo de “la gorda de exactas”, ellos hicieron que mi paso por la facultad fuera una de las mejores experiencias de mi vida. Y por supuesto, quería decirle gracias a Betiana, mi amiga incondicional por más de un cuarto de siglo.

También quiero agradecer a todos mis compañeros del refugio, su compañerismo y su amor y devoción por los animales es una luz en medio de un mundo tan oscuro y estoy feliz y orgullosa de sentirme guiada por esa luz.

Finalmente quiero agradecer a todas las personas que apoyan a la Ciencia y sienten que ésta es una inversión para el futuro, sin todos ustedes no hubiera podido recorrer este camino.

Gracias 😊

Parte de los resultados del presente trabajo se encuentran publicados en: Elimination of *Pseudomonas aeruginosa* through Efferocytosis upon Binding to Apoptotic Cells. Darío Capasso\*, María Victoria Pepe\*, Jéssica Rossello, Paola Lepanto, Paula Arias, Valentina Salzman and Arlinet Kierbel, PLOS Pathogens. (2016). doi:10.1371/journal.ppat.1006068. \*Co-primeros autores.

## Resumen

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria ambiental de amplia distribución, pero también es un patógeno oportunista que puede causar infecciones agudas de gran severidad en heridos y quemados, e infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística, lo que conlleva a altos índices de mortalidad. En estos pacientes, un factor determinante de la cronicidad de la infección es la formación de biofilms. En las etapas iniciales de la formación de un biofilm, bacterias que se encuentran nadando libremente son reclutadas sobre una superficie, donde son capaces de formar estructuras multicelulares.

Anteriormente reportamos que *P. aeruginosa* se adhiere a células epiteliales polarizadas formando agregados. Demostramos que la formación de estas estructuras bacterianas multicelulares ocurre *de novo* y en el orden de minutos sobre la superficie epitelial por el reclutamiento de bacterias planctónicas. También vimos que estos agregados se forman sobre células apoptóticas extruidas de la monocapa. Basándonos en su morfología, clasificamos a dichas células como apoptóticas tardías.

En este trabajo de tesis caracterizamos en más detalle las células apoptóticas a las que se une *P. aeruginosa*. Mediante estudios de microscopía confocal observamos que estas células poseen bajo contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno y de ADN, lo cual es característico de etapas avanzadas del proceso de apoptosis. También estudiamos la formación de los agregados durante los primeros minutos de infección utilizando videomicroscopía confocal, técnica que nos permite seguir el comportamiento de bacterias individuales. Vimos que las bacterias se adhieren a las células apoptóticas por un polo y que su distribución sobre la célula es heterogénea, habiendo zonas donde las bacterias se adhieren en mayor densidad. Encontramos que esta distribución está determinada, en parte, por las características de la membrana plasmática de la célula apoptótica. Mediante microscopía electrónica de barrido vimos que las células apoptóticas a las que se unen las bacterias presentan, en su membrana plasmática, un gran número de cuerpos apoptóticos, lo que les otorga una morfología intrincada.

En la segunda parte de este trabajo mostramos que *P. aeruginosa*, luego de unirse a la célula apoptótica, es internalizada por las células adyacentes de la monocapa mediante eferocitosis (el proceso por el cual fagocitos profesionales y no profesionales internalizan y degradan células apoptóticas), ya que puede ser encontrada dentro de células que además contienen material apoptótico internalizado y, al modular la eferocitosis, aumentándola o disminuyéndola, la internalización de la bacteria se ve afectada en el mismo sentido.

Por último, vimos que, dentro de la célula, *P. aeruginosa* se encuentra en vesículas que poseen características lisosomales donde, finalmente, es eliminada.

Este trabajo es relevante en el contexto de la fibrosis quística, ya que los individuos que tienen esta enfermedad poseen un número exacerbado de células apoptóticas, debido a un aumento en la apoptosis y a una deficiente eferocitosis, lo que puede favorecer la colonización por *P. aeruginosa*, así como limitar su eliminación. Estos hallazgos también son importantes en casos de infecciones en individuos heridos o quemados ya que las heridas presentan un gran número de células apoptóticas. Comprender el modo de colonización, mediante el estudio de la interacción de la bacteria con el sustrato, así como los mecanismos de eliminación por parte de las células hospedadoras ofrece información relevante para indagar tanto acerca de la prevención de infecciones por esta bacteria, como en posibles tratamientos. Teniendo en cuenta esto, la modulación positiva de la eferocitosis podría ser un enfoque terapéutico atractivo ya que no solo contribuiría a disminuir la colonización, sino también a la eliminación de la bacteria.

# ÍNDICE

## Contenido

INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Infecciones agudas en heridas causadas por <i>P. aeruginosa</i> .....	12
1.2. Infecciones crónicas causadas por <i>P. aeruginosa</i> en pacientes con fibrosis quística.....	12
1.3. Aislamientos clínicos de <i>P. aeruginosa</i> : fenotipo mucoso y no mucoso ....	13
1.4. Arquitectura e integridad epitelial .....	14
1.5. Mantenimiento de la integridad epitelial: Extrusión celular .....	15
1.6. Cambios morfológicos y bioquímicos de las células durante el proceso de apoptosis .....	17
1.7. Eferocitosis: remoción de células apoptóticas.....	20
1.8. Eferocitosis y patogénesis.....	25
1.9. Eferocitosis y fibrosis quística .....	26
1.10. Internalización y sobrevivencia intracelular de <i>P. aeruginosa</i> .....	26
1.11. Modelo de células epiteliales polarizadas en cultivo.....	27
1.12. Antecedentes de nuestro grupo .....	28
OBJETIVOS .....	33
RESULTADOS .....	35
3. Caracterización de las células a las cuales se une <i>P. aeruginosa</i> y dinámica del proceso de adhesión.....	36
3.1. Descripción del modelo de trabajo. ....	36
3.2. <i>P. aeruginosa</i> se une a células apoptóticas con bajo contenido de especies reactivas de oxígeno.....	39
3.3. Las células apoptóticas a las que se une <i>P. aeruginosa</i> no presentan ADN intracelular .....	42
3.4. Estudio de la dinámica de la formación de agregados de <i>P. aeruginosa</i> sobre células apoptóticas .....	43
3.5. <i>P. aeruginosa</i> se une a células apoptóticas que presentan su superficie vesiculizada.....	51
3.6. Bacterias agrupadas, presentes en el medio, pueden incorporarse a los agregados formados sobre células apoptóticas .....	57
4. <i>P. aeruginosa</i> es internalizada en células epiteliales a través del mecanismo de eferocitosis.....	61
4.1. Ocurre eferocitosis en el sistema de células en cultivo utilizado.....	61
4.2. La internalización de <i>P. aeruginosa</i> en células epiteliales está asociada a la internalización de células apoptóticas.....	66
4.3. La asociación entre bacterias y material apoptótico internalizado también se observa en células epiteliales de pulmón.....	68
4.4. Aislamientos de <i>P. aeruginosa</i> de pacientes con fibrosis quística también pueden ser encontrados junto a material apoptótico eferocitado .....	69

4.5. Al modular la eferocitosis se afecta en el mismo sentido la internalización de <i>P. aeruginosa</i> .....	71
5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> es eliminada dentro de células epiteliales .....	77
5.1. Las bacterias y el material apoptótico intracelular se localizan en lisosomas	77
5.2. Los agregados de <i>P. aeruginosa</i> son susceptibles a los tratamientos con antibióticos aplicados en nuestros experimentos .....	81
5.3. <i>P. aeruginosa</i> es eliminada dentro de las células epiteliales .....	82
5.4. La viabilidad de las células epiteliales no se ve afectada por la presencia de la bacteria .....	84
CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN .....	86
6.1. <i>P. aeruginosa</i> se adhiere sobre células apoptóticas tardías .....	87
6.2. El seguimiento individual de las bacterias con alta resolución temporal posibilitó estudiar fenómenos relevantes, inadvertidos con otro tipo de enfoques	88
6.3. <i>P. aeruginosa</i> se adhiere a zonas de la membrana plasmática con características morfológicas particulares .....	89
6.4. La incorporación de clumps de bacterias previamente formados también contribuye a la formación del agregado .....	90
6.5. <i>P. aeruginosa</i> es internalizada en células epiteliales mediante eferocitosis	92
6.6. <i>P. aeruginosa</i> es eliminada intracelularmente .....	92
6.7. La eferocitosis juega un papel importante en la interacción de algunos patógenos con sus células hospedadoras .....	93
MATERIALES Y MÉTODOS.....	95
7.1. Cepas bacterianas .....	96
7.2. Crecimiento de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> .....	96
7.3. Infección.....	96
7.4. Líneas celulares .....	97
7.5. Cultivo de las líneas celulares .....	97
7.6. Anticuerpos y reactivos .....	98
7.7. Generación de células apoptóticas <i>in vitro</i> .....	99
7.8. Tratamiento con AnexinaV .....	99
7.9. Adición de células apoptóticas .....	99
7.10. Preparación de muestras para inmunofluorescencia .....	100
7.11. Adquisición de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia.....	101
7.12. Preparación de muestras y adquisición de imágenes por microscopía electrónica de barrido .....	101
7.13. Videomicroscopía confocal.....	102
7.14. Distribución espacial de las bacterias sobre la célula apoptótica.....	102
7.15. Medición de la intensidad de fluorescencia de la marca de AnexinaV .....	102

7.16. Medición de ERO intracelular.....	103
7.17. Medición del contenido intracelular de ADN.....	103
7.18. Análisis de células apoptóticas por citometría.....	103
7.19. Cuantificación de la eferocitosis por citometría.....	104
7.20. Cuantificación de la eferocitosis por microscopía.....	104
7.21. Cuantificación de la internalización de bacterias por microscopía.....	106
7.22. WesternBlot.....	107
7.23. Estudio de la viabilidad bacteriana.....	107
7.24. Ensayo de protección al antibiótico.....	107
7.25. Estudio de la viabilidad celular.....	108
7.26. Análisis de imágenes.....	108
7.27. Análisis estadístico.....	109
BIBLIOGRAFÍA.....	110

# INTRODUCCIÓN

## 1. Introducción

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gram-negativa perteneciente a la clase de las gammaproteobacterias. Se trata de una bacteria ambiental ubicua que normalmente habita en el suelo y la superficie de medioambientes acuosos. Como otras especies del género *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* es una bacteria versátil, cuyo genoma cuenta con aproximadamente 6000 genes [1], permitiéndole una gran capacidad metabólica, lo cual se refleja en su habilidad de ocupar diferentes nichos [2]. *P. aeruginosa* presenta una alta resistencia intrínseca a los antibióticos, que se atribuye a la baja permeabilidad de la membrana a los mismos, así como también a la presencia de bombas de eflujo que los expulsan fuera de la célula [3]. Es considerada un patógeno oportunista que puede causar infecciones agudas y/o crónicas. Se la encuentra asociada a un amplio rango de infecciones que afectan la piel, oídos, ojos, tracto urinario, vías respiratorias y epitelio pulmonar. Es responsable del 11-14% de las infecciones nosocomiales comunes y del 13-22% de las infecciones en unidades de terapia intensiva [4], siendo uno de los agentes infecciosos más virulentos. La alta frecuencia de cepas de *P. aeruginosa* que causan infecciones nosocomiales y el incremento de cepas multi-resistentes a drogas representa una severa amenaza a la salud humana. Las infecciones agudas causadas por esta bacteria representan un grave problema en pacientes inmunocomprometidos, quemados, heridos o aquellos que requieren ventilación mecánica. Dentro de las infecciones nosocomiales en pacientes con ventilación mecánica, se le atribuye a *P. aeruginosa* una tasa de mortalidad de aproximadamente el 50% [5]. Las infecciones pulmonares crónicas con *P. aeruginosa* se dan comúnmente en pacientes con fibrosis quística, en quienes afecta severamente la calidad y expectativa de vida. La infección es de hecho, uno de los principales factores que contribuye a la mortalidad [6].

### **1.1. Infecciones agudas en heridas causadas por *P. aeruginosa***

La superficie intacta de la piel actúa como una primera barrera de defensa frente a los patógenos. Las heridas generan una brecha, a través de la cual las bacterias patógenas ingresan al hospedador. La superficie de la herida es un ambiente rico en proteínas conformado por tejido muerto no vascularizado. La falta de vascularización en la herida dificulta la migración de células inmunes a dicha zona, como así también la llegada de agentes antimicrobianos administrados sistémicamente [7]. Este ambiente resulta un nicho susceptible de ser colonizado por bacterias. Cuando las bacterias alcanzan la zona de la herida, se adhieren y pueden proliferar dando comienzo al desarrollo de un biofilm, el cual se trata de una estructura multicelular agregada y sésil, generalmente asociada a superficie y embebida en una matriz extracelular formada por polímeros secretados por las propias bacterias que lo conforman. Dicha matriz protege a las bacterias del accionar de los antibióticos y del sistema inmune. Durante las primeras horas luego de que ocurra la herida, miembros residentes de la flora bacteriana de la piel, como los estafilococos gram-positivos, son capaces de colonizar la superficie de la herida. Aproximadamente una semana después, puede ocurrir una colonización secundaria por otras bacterias, como *P. aeruginosa* [8]. Está reportado que, en términos de área, las heridas colonizadas por *P. aeruginosa* se muestran más extensas que aquellas que no están colonizadas por la bacteria. La presencia de *P. aeruginosa* parece retrasar o incluso evitar el proceso de curado [8]. Así, la contaminación con *P. aeruginosa* puede causar una infección invasiva y resultar en sepsis. Recientemente Schwarzer *et al.*, usando un modelo en monocapas de células epiteliales, mostraron que *P. aeruginosa* migra hacia las células muertas presentes en el borde de la herida [9].

### **1.2. Infecciones crónicas causadas por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística**

Las infecciones crónicas causadas por *P. aeruginosa* ocurren con frecuencia en pacientes con fibrosis quística, donde la bacteria causa una falla progresiva en la función pulmonar [6]. La fibrosis quística es una enfermedad autosómica

recesiva, causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) [10]. El defecto del canal CFTR afecta principalmente el transporte de cloruro, lo cual está asociada a una hiperabsorción de sodio y agua en la superficie epitelial, provocando la deshidratación del mucus pulmonar [11]. El canal CFTR también conduce bicarbonato, que regula el pH de la película de líquido de las vías aéreas. El cambio en el pH afecta la eliminación de las bacterias que entran por esta vía, a través de la reducción de la función antimicrobiana de los péptidos secretados por el sistema inmune innato [12]. A su vez, el desbalance osmótico generado por la reducción en la concentración de aniones provoca también acumulación y un incremento de la viscosidad del mucus pulmonar. La acumulación de secreción espesa en el pulmón trae aparejado un impedimento en la limpieza mucociliar, la cual se encarga de barrer partículas y microorganismos inhalados. El microambiente del pulmón fibroquístico ofrece un nicho ideal para la colonización por una amplia diversidad de especies bacterianas, entre las cuales *P. aeruginosa* es la más prevalente [13]. El daño pulmonar causado por la presencia constante de la infección y por la respuesta inmune inflamatoria, que es inefectiva para eliminar al patógeno, es la principal causa de muerte en pacientes con esta enfermedad.

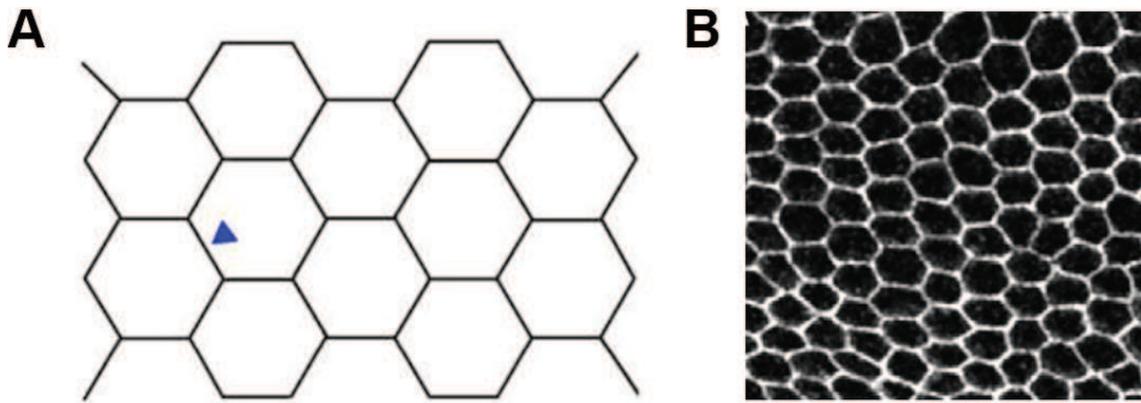
### **1.3. Aislamientos clínicos de *P. aeruginosa*: fenotipo mucoso y no mucoso**

Como se dijo anteriormente, *P. aeruginosa* es capaz de establecer infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística. Un factor determinante en el establecimiento de la cronicidad es la formación de biofilms. En el ambiente del pulmón fibroquístico, sólo una porción de la variedad de cepas de *P. aeruginosa* que infecta es capaz de prosperar. Una variante fenotípica que se selecciona con alta frecuencia es el fenotipo mucoso. La conversión hacia un fenotipo mucoso parece estar fomentada por el microambiente único del pulmón fibroquístico. Este fenotipo no se observa fuera del hospedador, aunque es posible generar la conversión de una cepa de fenotipo no mucoso a uno mucoso bajo ciertas condiciones de cultivo que emulan el microambiente pulmonar en pacientes con fibrosis quística [14]. Una característica de las cepas mucosas es

su capacidad para sintetizar una gran cantidad del exopolisacárido alginato. El alginato protege a las bacterias de la deshidratación, incrementa la resistencia a la opsonización, la fagocitosis y al tratamiento con antibióticos [15]. La conversión a un fenotipo mucoso está asociada, en los pacientes con fibrosis quística, a un aumento de la mortalidad [16]. Poblaciones mixtas de cepas mucosas y no mucosas pueden coexistir en los pulmones de los pacientes fibroquísticos. El valor adaptativo de las poblaciones mixtas de *P. aeruginosa* recae en la diversidad fenotípica y funcional, la cual contribuye a la adaptación bajo condiciones de estrés, permitiendo la colonización a largo plazo del pulmón fibroquístico.

#### **1.4. Arquitectura e integridad epitelial**

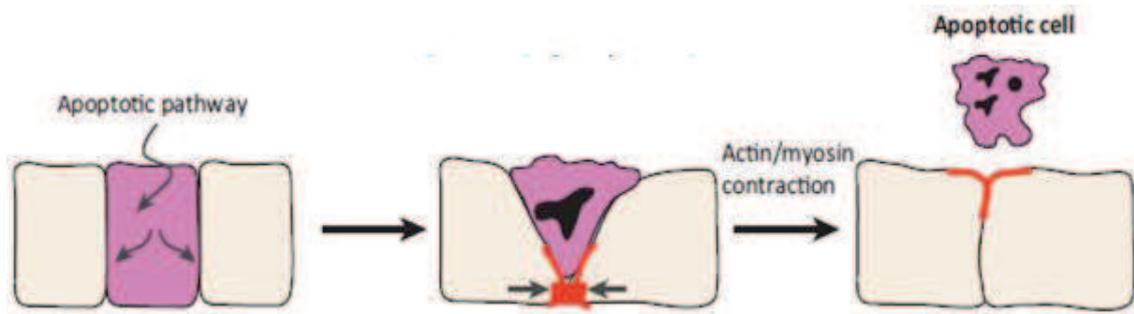
Como parte del sistema inmune innato, las células epiteliales representan la primera línea de defensa contra los patógenos. Éstas constituyen una barrera difícil de penetrar gracias a que forman láminas de células estrechamente unidas. Las uniones entre células mantienen la integridad de los epitelios, como así también su polaridad, constituida por un dominio apical y otro basolateral de composición proteica distinta. En conjunto, las uniones adherentes y estrechas entre las células del epitelio conforman el complejo apical de unión, el cual no sólo mantiene la polaridad, sino que rodea a las células y las conecta unas con otras. De esta manera se genera una red que asocia a las células epiteliales entre sí, permitiéndoles responder de manera integrada a través de la acción coordinada de sus citoesqueletos. Las redes de uniones entre células epiteliales asumen distintos patrones. Los patrones más estables, propios de tejidos maduros, corresponden al de una estructura tipo “panal de abeja” (Figura 1.1). Pero los epitelios son estructuras dinámicas y cuando se produce una perturbación, las células son capaces de responder en forma coordinada y reorganizarse, formando nuevas uniones célula-célula [13].



**Figura 1.1. Organización celular de un epitelio maduro.** A) Vista apical esquematizada de un epitelio. El triángulo señala una unión célula-célula. B) Patrón en forma de “panal de abeja” visto desde la cara apical de células epiteliales del ala de una pupa madura de *Drosophila* [17].

### 1.5. Mantenimiento de la integridad epitelial: Extrusión celular

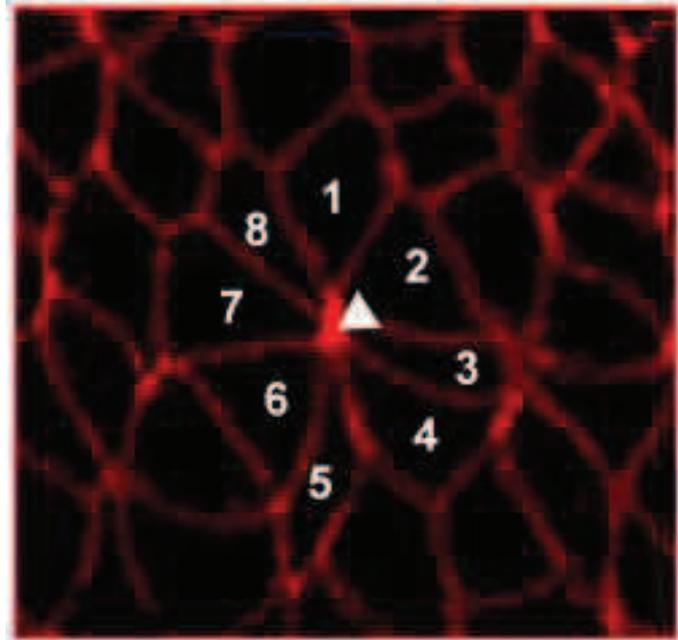
El mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial previene la inflamación, facilita la correcta señalización celular e impide la invasión de patógenos. Los epitelios mantienen su homeostasis a través de mecanismos que controlan el número de células [18]. En un epitelio, las células están renovándose continuamente mediante división y muerte celular, por lo que sus tasas de renovación se encuentran dentro de las más altas del organismo [19]. Las células que mueren deben ser eliminadas, manteniendo la función de barrera del epitelio. Esto es posible gracias a un proceso denominado extrusión celular, que remueve a las células senescentes y al mismo tiempo repara las brechas que la remoción de éstas generan. Cuando una célula epitelial muere por apoptosis, es removida en forma controlada por la acción conjunta de las células que la rodean. Así, una célula destinada a morir señala a las células vecinas y éstas forman un anillo de actina-miosina a su alrededor. Este anillo provee la fuerza de contracción necesaria para extruir a la célula en cuestión [20,21]. El anillo se contrae circunferencialmente hacia la cara basal comprimiendo a la célula y expulsándola hacia la superficie apical. Esto, a su vez acerca, por debajo de la célula apoptótica, a las células vecinas que forman entre sí nuevas uniones intercelulares, lo que previene que se genere una brecha en el epitelio (Figura 1.2).



**Figura 1.2. Representación esquemática del proceso de extrusión celular.** Las células senescentes del epitelio desencadenan señales que generan, en simultáneo, la muerte de la célula y su extrusión para preservar la integridad del epitelio. Esquema adaptado de Rosenblatt *et al.* (2013) [22].

En vertebrados se vio que la extrusión es apical, por lo que la remoción de las células se da hacia el lumen. Este proceso ocurre en células apoptóticas que deben ser eliminadas del epitelio, pero también pueden extruirse células vivas cuando es necesario controlar el número celular en regiones muy pobladas y evitar que se formen aglomerados. Las células vivas extruidas mueren por falta de contacto con la matriz mediante un proceso denominado anoikis. Cuando existen problemas en la regulación de la extrusión apical, puede ocurrir extrusión basal, donde la célula es desplazada por debajo del epitelio [23].

Cuando una célula es removida mediante el proceso de extrusión, las células vecinas que la rodeaban se reacomodan espacialmente formando una nueva unión multicelular. Dichas multiuniones están típicamente conformadas por cuatro o más células. Estas estructuras multicelulares, en las cuales varias células contactan en un punto central, se denominan rosetas (Figura 1.3).



**Figura 1.3. Roseta en células epiteliales de *Drosophila*.** Células epiteliales de un embrión de *Drosophila* que expresan un marcador de membrana (rojo). La roseta está conformada por 8 células. El punto central donde contactan se indica con un triángulo. Figura adaptada de Harding *et al.* (2014).

#### **1.6. Cambios morfológicos y bioquímicos de las células durante el proceso de apoptosis**

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada. Ocurre durante el desarrollo, el envejecimiento y como mecanismo homeostático de mantenimiento de la población celular en los tejidos de organismos multicelulares. La apoptosis también ocurre como mecanismo de defensa del sistema inmune y cuando las células son dañadas debido a enfermedades o a agentes nocivos. Es un proceso coordinado y dependiente de energía caracterizado por eventos específicos, como la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, la activación de caspasas, la pérdida de la asimetría de fosfolípidos de la membrana plasmática, el remodelamiento del citoesqueleto, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, el *blebbing* de la membrana plasmática seguido de la fragmentación del citoplasma en cuerpos apoptóticos, y la posterior liberación de estos cuerpos.

A continuación, se describen algunos cambios morfológicos y bioquímicos que tienen lugar durante el proceso apoptótico.

### *Alteraciones de las funciones mitocondriales*

Las alteraciones de las funciones mitocondriales son eventos tempranos ya que generalmente ocurren mucho antes que puedan verse cambios morfológicos asociados al proceso de apoptosis. Algunos de los mecanismos que explican la función de la mitocondria durante la apoptosis incluyen la liberación de proteínas apoptogénicas en el citoplasma luego de la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, la pérdida de funciones mitocondriales indispensables para la supervivencia celular y la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) [24]. Estas especies, como el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) o el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) se forman por la reducción parcial del oxígeno. ERO celular es generado endógenamente en un proceso mitocondrial de fosforilación oxidativa [25]. En niveles fisiológicos, ERO puede funcionar como “mensajeros redox” en el señalamiento intracelular, mientras que un exceso de ERO induce la muerte celular promoviendo la apoptosis. El aumento de ERO intracelular es un evento temprano en el proceso de apoptosis [26,27].

### *Activación de caspasas*

Otro evento temprano, característico de la apoptosis clásica, es la activación de un grupo de proteasas llamadas caspasas. Actualmente se conocen 8 caspasas que participan en la ejecución del desmantelamiento de la célula apoptótica [24]. Las caspasas involucradas en la apoptosis pueden dividirse en dos grupos: las iniciadoras y las ejecutoras. Las caspasas iniciadoras se activan por la formación de complejos heteroméricos y un posterior clivaje. Una vez activadas, éstas son capaces de activar, mediante clivaje, a caspasas ejecutoras, como las caspasas 3 y 6. Su activación resulta en los cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la apoptosis. Varias características del proceso de apoptosis, como la condensación de la cromatina y la exposición de fosfatidilserina están mediadas por proteínas blanco de la caspasa 3. Las caspasas 3 y 7 pueden activar a una DNasa mediante el clivaje de su inhibidor, la cual es responsable de la degradación del ADN durante la apoptosis (DNasa activada por caspasa, DAC).

### *Distribución de la fosfatidilserina durante la apoptosis*

La membrana plasmática de células eucariotas está caracterizada por la distribución asimétrica de sus fosfolípidos, los componentes lipídicos más

abundantes de la membrana. Aminofosfolípidos como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina están generalmente enriquecidos en la cara citoplasmática de la membrana, mientras que la fosfatidilcolina, la esfingomielinina y los glicoesfingolípidos están situados en la cara externa. Durante la apoptosis, la fosfatidilserina se transloca hacia la cara externa de la membrana plasmática. Este evento se ha considerado uno de los marcadores más importantes de la etapa inicial de la apoptosis y ha sido asociado a tres mecanismos posibles. 1) La inactivación de flipasas, un grupo de proteínas transmembrana encargadas del transporte activo de aminofosfolípidos desde la cara externa hacia la cara interna, 2) la activación de scramblasas, translocadores de fosfolípidos ubicados en la membrana, encargadas de transportar lípidos entre ambas caras y 3) la activación de transportadores-ABC, una gran familia de canales controlados por ATP, capaces de transportar una gran variedad de sustratos dentro y fuera de la célula. [28].

En el laboratorio, para detectar células apoptóticas, se usa AnexinaV conjugada a un fluoróforo [29]. La proteína AnexinaV se une específicamente a fosfatidilserina. Fisiológicamente, la AnexinaV actúa como un factor anticoagulante a través de la competencia con factores de coagulación por los sitios de unión a fosfatidilserina expuesta en la superficie de células endoteliales y plaquetas activadas [30].

#### *“Blebbing” de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos*

Otra característica distintiva de la apoptosis es la aparición de “blebs” (especie de abultamientos o burbujas de la membrana plasmática), que dan lugar a la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales pueden desprenderse de las células. En su interior los cuerpos apoptóticos pueden contener fragmentos de cromatina condensada y proteínas. Tienen un tamaño de 0,18 - 5  $\mu\text{m}$  de diámetro [31,32]. Luego de su liberación activada por calcio, los cuerpos apoptóticos se dispersan por el espacio intercelular, reclutando fagocitos al sitio donde se encuentra la célula apoptótica, los cuales son capaces de internalizarla y degradarla. Los cuerpos apoptóticos en circulación también pueden alterar el estado biológico de otras células [33]. Luego de ser fagocitados por fagocitos profesionales, estos cuerpos pueden participar en la presentación antigénica a

linfocitos T y en la presentación de autoantígenos a linfocitos B. La internalización de cuerpos apoptóticos también puede conducir a la inmunosupresión [32].

### *Degradación del ADN durante la apoptosis*

En las células apoptóticas, el ADN es clivado por DAC, la cual se transloca al núcleo [24]. La degradación del ADN se da en dos etapas, en primer lugar se fragmenta en trozos de entre 50 y 300 kb y luego se degrada en fragmentos de aproximadamente 180 pares de bases, denominados unidades nucleosomales [34]. Una característica de las células apoptóticas tardías es la disminución en el contenido de ADN [35]. Esto puede deberse, en parte, a la pérdida de éste mediante la liberación de cuerpos apoptóticos, pero también a un proceso enzimático mediado por la DNasa I presente en el suero. Existen tres clases de nucleasas que degradan el ADN celular durante la apoptosis: Las DNasas dependientes de caspasas que están dentro de las células apoptóticas y son responsables de la degradación escalonada; las nucleasas lisosomales de los fagocitos que internalizan a la célula apoptótica, y las nucleasas presentes en el suero que interactúan con células apoptóticas tardías [36].

### **1.7. Eferocitosis: remoción de células apoptóticas.**

Incluso en tejidos con alta tasa de recambio celular, es raro encontrar células apoptóticas ya que ellas son eliminadas rápidamente mediante eferocitosis [37]. La eferocitosis (del latín “efferre”: enterrar o llevar a la tumba) es el proceso por el cual, fagocitos profesionales (como macrófagos) y no profesionales (como células epiteliales) ingieren y degradan células apoptóticas. Este proceso es crucial para el mantenimiento de la homeostasis, el desarrollo embrionario, la resolución de la inflamación y la modulación de la respuesta inmune.

Debido a que los fagocitos generalmente no están presentes en el sitio de apoptosis, las células apoptóticas deben “alertarlos” acerca de su presencia. Para ello, éstas liberan distintas moléculas denominadas “find-me signals” que atraen a los fagocitos a través de un gradiente quimiotáctico. ATP, UTP, lípido esfingosina 1- fosfato (S1P), lisofosfatidilcolina (LPC), y fractalkina son ejemplos

de find-me signals. Algunos de estas moléculas, como el ATP, pueden actuar también como “patrones moleculares asociados a peligro” (DAMPs por sus siglas en inglés) alertando al sistema inmune innato. Existe evidencia de que el ATP o S1P pueden activar a los fagocitos aumentando su capacidad eferocítica [37]. Los fagocitos pueden sensar estas moléculas a través de receptores en su membrana (P2Y2, S1PRs, G2A y CXCR3 respectivamente).

Una vez que el fagocito llega a las cercanías de la célula apoptótica, éste debe discriminar células vivas de muertas para prevenir el desarrollo de inflamación no deseada. Las células apoptóticas presentan en su membrana moléculas denominadas “eat-me signals” que favorecen la unión de los fagocitos a estas células a través de distintos receptores. Estos receptores pueden interactuar directamente con sus ligandos, sin embargo, la mayoría de las interacciones ocurren a través de una molécula puente. El “eat-me signal” más caracterizado es la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática [38]. Los fagocitos reconocen la fosfatidilserina vía receptores de membrana como la proteína de membrana 4 de células T (TIM-4), el inhibidor de angiogénesis específico de cerebro 1 (BAI 1), y la estabilina-2 presente en células endoteliales. La fosfatidilserina también puede encontrarse expuesta en bajos niveles en células vivas o activadas, sin embargo, estas células no son internalizadas por fagocitos. Esto se debe a la presencia de “don’t eat-me signals” como CD31, CD47, y CD61 en la membrana de estas células, los cuales pueden regular la eferocitosis de forma negativa [37].

La internalización de la célula apoptótica está regulada por el balance entre las GTPasas RhoA y Rac1. Las Rho GTPasas son interruptores moleculares que tienen una configuración activa (unidas a GTP) o inactiva (unidas a GDP). La unión de la célula apoptótica a sus receptores en los fagocitos resulta en la regulación de la actividad de dos complejos: CrkII/ELMO/Dock180 y ABCA1/GULP, lo que desemboca, en ambos casos, en la activación de Rac1, que genera rearrreglos del citoesqueleto y una posterior internalización de la célula apoptótica. Rac1 y RhoA tienen roles opuestos en la eferocitosis: Rac1 la fomenta, mientras que RhoA la inhibe [39]. Rac1 induce la formación de prolongaciones de membrana, que son características de la eferocitosis. En contraste, RhoA induce la formación de fibras de estrés, adhesiones focales y la propagación celular [40]. Estos fenómenos ocurren tanto en fagocitos

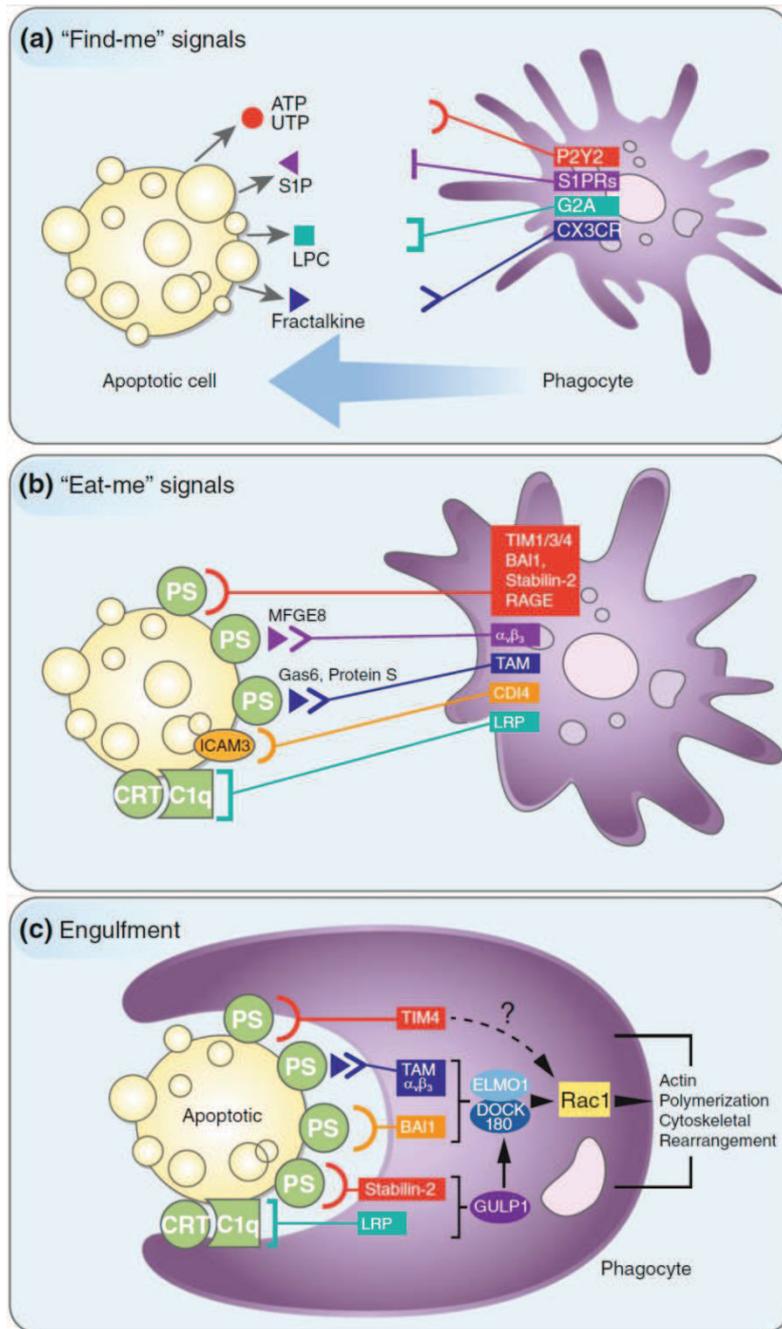
profesionales [41] como en no profesionales [42]. La internalización de células apoptóticas es morfológicamente diferente a otros tipos de fagocitosis. Mientras que en la fagocitosis mediada por receptor la partícula parece ser “absorbida” dentro de la célula, la eferocitosis implica la formación activa de prolongaciones de membrana similares a las observadas durante la macropinocitosis. Una vez internalizada por el fagocito, la célula apoptótica, contenida en una vesícula denominada eferosoma, es degradada mediante la fusión del eferosoma con lisosomas, donde proteasas y nucleasas se activan degradando a la célula apoptótica.

Si bien los fagocitos profesionales, como los macrófagos, son los principales encargados de la eferocitosis, los fagocitos no profesionales, como las células epiteliales y los fibroblastos también son de gran importancia en la remoción de células apoptóticas y el mantenimiento de la homeostasis. Son llamados fagocitos no profesionales debido a su menor capacidad eferocítica cuando se los compara con los profesionales, sin embargo, los fagocitos no profesionales tienen un rol importante en tejidos donde los macrófagos son escasos o no tienen acceso, como en los alvéolos del pulmón o en el epitelio intestinal. Por ejemplo, en el caso de la involución del tejido mamario luego de la lactancia, son las células epiteliales de la glándula mamaria, más que los macrófagos, quienes remueven un número masivo de células apoptóticas [43]. Los mecanismos involucrados en la ingestión y degradación de células apoptóticas pueden ser diferentes según quién sea el fagocito. Por ejemplo, Parnaik *et al.* (2000) observaron que cuando las células de la microglía son enfrentadas a neuronas apoptóticas, rápidamente las ingieren y degradan. Sin embargo, cuando las mismas células apoptóticas son enfrentadas a células epiteliales, éstas no las ingieren directamente, sino que entran en contacto con ellas rodeándolas de prolongaciones transitorias. Luego de varias horas, internalizan a la célula apoptótica abruptamente, por lo que, si bien parece haber un reconocimiento inicial, la eferocitosis ocurre varias horas después. Esto puede deberse a que las células apoptóticas solo adquieran la capacidad de estimular células epiteliales para su eferocitosis en estadios tardíos del proceso de apoptosis [44].

La apoptosis ocurre en organismos sanos como mecanismo de recambio celular, por lo que debe ser un proceso no inflamatorio y no inmunogénico. Se ha visto

que los fagocitos que internalizaron células apoptóticas secretan citoquinas anti-inflamatorias como  $TGF\beta$  e interleuquina-10 (IL-10). Más aun, la eferocitosis activamente suprime la liberación de citoquinas pro-inflamatorias. En la ausencia de una eficiente eferocitosis, ocurre necrosis secundaria de la célula apoptótica seguida por lisis, lo que genera que se libere el contenido intracelular provocando una respuesta inflamatoria [37].

El mantenimiento de la integridad epitelial depende en gran medida de la eferocitosis, debido a que, como consecuencia de este proceso, el fagocito libera al medio factores de crecimiento, lo que genera que se activen señales moleculares relacionadas con el mantenimiento del epitelio y la proliferación celular [40].



**Figura 1.4. Reclutamiento de fagocitos al sitio de apoptosis y posterior internalización de la célula apoptótica.** A) célula apoptótica liberando find-me signals como ATP, UTP, S1P, LPC, y fractalkina las cuales son sensadas por un fagocito mediante sus receptores (P2Y2, S1PRs, G2A, and CX3CR3 respectivamente). B) el fagocito reconoce a la célula apoptótica mediante eat-me signals expuestos. El eat-me signal más común, la fosfatidilserina, es reconocida por sus receptores específicos TIM1, TIM3, TIM4, BAI1, stabilin-2, y RAGE, así como por moléculas puente específicas como MFG-E8, Gas6, y proteína S. C) La polimerización de la actina y los rearrreglos del citoesqueleto necesarios para la internalización son iniciados mediante activación de la vía de Rac1. Figura adaptada de *Martinez et. al.* [37].

## 1.8. Eferocitosis y patogénesis

En el último tiempo, una serie de trabajos han puesto en evidencia un rol antes inadvertido de la eferocitosis: el de mecanismo de defensa contra infecciones microbianas. Por otro lado, distintos trabajos describen también como algunos microorganismos subvierten el proceso eferocítico como estrategia de infección. Como ejemplo donde la eferocitosis es parte de un mecanismo de defensa puede mencionarse el caso de *Mycobacterium tuberculosis*. *M. tuberculosis* normalmente es fagocitada por macrófagos, donde impide que las vesículas endocíticas en que se aloja maduren a lisosomas activos logrando así sobrevivir dentro de la célula. Además, inhibe la respuesta apoptótica en los macrófagos, e induce la necrosis, lo que le facilita la propagación a otras células e impide su eliminación. Sin embargo, por razones aún desconocidas, algunos macrófagos infectados entran en apoptosis, y son luego internalizados por otros macrófagos mediante eferocitosis. En estos casos, *M. tuberculosis* es eliminada dentro del segundo macrófago [45]. Otro ejemplo donde la eferocitosis funciona como mecanismo bactericida es el de *Klebsiella pneumoniae*. Esta bacteria induce la apoptosis de los macrófagos que la internalizan, que luego son eferocitados por otros macrófagos. Esto lleva a una eficiente eliminación de esta bacteria por parte del segundo macrófago. Si se inhibe la eferocitosis mediante el uso de citocalasina D, la función bactericida se ve afectada y la bacteria puede proliferar. Notablemente, aislamientos clínicos de esta bacteria, que no producen la muerte del primer fagocito, son capaces de proliferar en macrófagos [46]. Contrariamente, hay otros microorganismos, como *Listeria monocytogenes* y *Leishmania major*, que sacan ventaja de la eferocitosis para llevar adelante el proceso infeccioso. *L. monocytogenes* aprovecha la eferocitosis para dispersarse por distintas células. Una vez internalizada, esta bacteria es capaz de escapar del fagosoma y activar mecanismos de regulación de la actina en la célula hospedadora, lo que le permite adquirir movilidad dentro del citosol. Finalmente, se forman protrusiones de la membrana, ricas en actina, que contienen bacterias. Estas protrusiones pueden liberarse generando vesículas que presentan fosfatidilserina expuesta en su superficie, que es reconocida por el receptor TIM en macrófagos, lo que genera la internalización de estas vesículas y la dispersión de la bacteria entre estas células [47]. *Leishmania*

*major* puede ser fagocitado por neutrófilos, donde sobrevive, pero no se reproduce. Luego de dos días estos neutrófilos entran en apoptosis y son eferocitados por los macrófagos que llegan al sitio de infección. De esta forma el parásito logra infectar a los macrófagos, sus células hospedadoras definitivas, donde es capaz de reproducirse [48].

### **1.9. Eferocitosis y fibrosis quística**

La consecuencia inmediata más importante de la eferocitosis es la remoción de células apoptóticas antes de que su membrana se permeabilice y libere contenido intracelular potencialmente tóxico. Así, la eferocitosis de neutrófilos es de especial importancia, debido a que éstos están en gran número durante los procesos infecciosos, tienen un período de vida muy corto y poseen un alto contenido intracelular de proteasas, mediadores inflamatorios y oxidantes [40]. Luego de la inducción de la inflamación pulmonar, los neutrófilos son rápidamente reclutados al sitio de inflamación y, luego de cumplir su función, entran en apoptosis [37]. Una de las características de la fibrosis quística es una marcada inflamación en las vías respiratorias y la acumulación de células apoptóticas. Esta enfermedad está también asociada con una eferocitosis ineficiente por fagocitos profesionales y no profesionales [49,50]. Se ha demostrado que, en pacientes con fibrosis quística, la eferocitosis de los neutrófilos apoptóticos está inhibida, lo que lleva a una respuesta inflamatoria prolongada [37]. Por otro lado, se ha visto un aumento en la expresión de RhoA en las células epiteliales de las vías respiratorias que inhibe la eferocitosis en este tipo celular. Por lo tanto, la inflamación pulmonar crónica en individuos con fibrosis quística podría deberse en parte, a una eferocitosis deficiente [40].

### **1.10. Internalización y sobrevida intracelular de *P. aeruginosa***

Pocos estudios han medido la sobrevida intracelular de *P. aeruginosa* por períodos prolongados en células no fagocíticas. Fleiszig *et al.* han reportado que *P. aeruginosa* es capaz de replicarse en células epiteliales dentro de blebs inducidos por ella misma mediante un mecanismo dependiente del sistema de secreción tipo 3 [51]. En este caso, los estudios fueron llevados adelante en

células sin polarizar. García-Medina *et al.*, han sugerido que esta bacteria es capaz de sobrevivir por tiempos prolongados en cultivos primarios de células epiteliales de tráquea de ratón [52]. Por el contrario, según De Assis *et al.*, células endoteliales humanas activadas con citoquinas proinflamatorias eliminan a *P. aeruginosa* intracelular [53]. Darling *et al.* observaron que, luego de infectar células epiteliales de pulmón con *P. aeruginosa*, existe un aumento inicial del número intracelular de bacterias pero, luego de 24 hs el recuento decae [54].

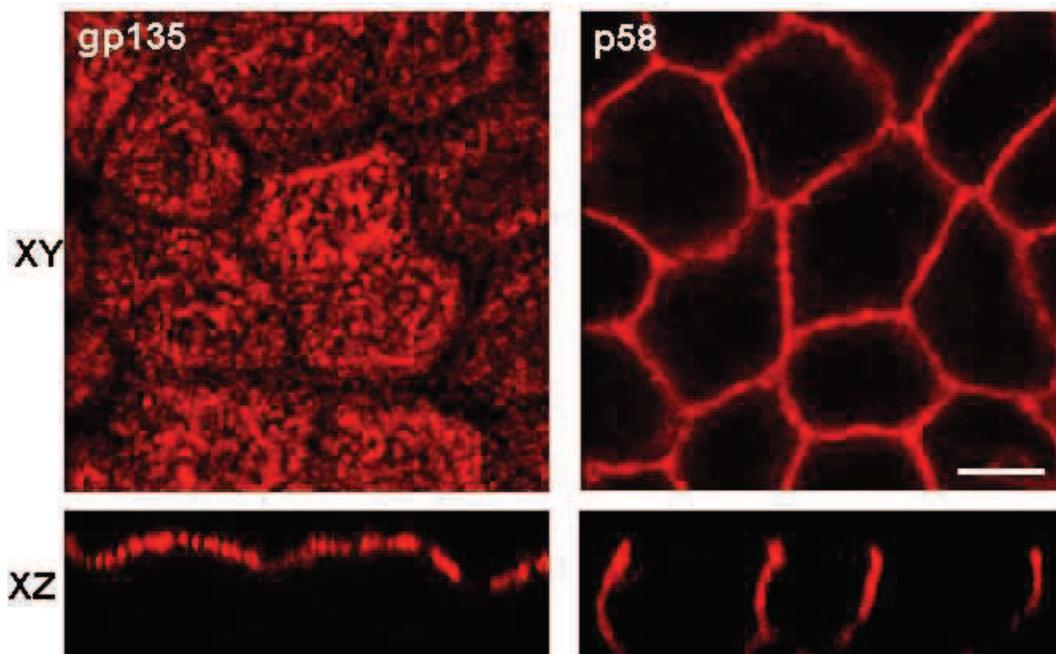
La controversia en el destino intracelular de *P. aeruginosa* también se ve en células fagocíticas como macrófagos. Yuan *et al.* postulan que esta bacteria sería eliminada dentro de macrófagos alveolares por un mecanismo que involucra la activación de la vía autofágica [55]. Sin embargo, Deng *et al.* ven que la activación de esta vía durante la infección con la bacteria inhibe su eliminación dentro de macrófagos [56].

Así, el rol de la internalización en el proceso infectivo no está claro aún, y es necesario profundizar la investigación en esta área.

### **1.11. Modelo de células epiteliales polarizadas en cultivo.**

Nuestro grupo de investigación viene utilizando desde hace muchos años el modelo de infección de células epiteliales polarizadas con *P. aeruginosa*. Cuando crecen sobre soportes permeables, distintas líneas de células epiteliales forman monocapas confluentes y polarizadas conectadas por uniones estrechas y adherentes, donde se diferencia una superficie apical y una basolateral. En este trabajo de tesis usamos como modelo de células epiteliales la línea Madin Darby Canine Kidney (MDCK) de túbulo colector renal de perro. Para permitir que las células polaricen, se siembran en soportes permeables conocidos como filtros *transwell*. Estos soportes cuentan con una membrana porosa sobre la cual se siembran las células distinguiéndose dos compartimientos: uno por arriba de la membrana del soporte (a donde se expone la superficie apical) y uno por debajo (a donde se expone la superficie basolateral). Las células crecidas mediante este sistema se polarizan, lo cual puede evidenciarse mediante la presencia de proteínas específicas de cada cara. En la Figura 1.5 se muestran monocapas de células epiteliales MDCK crecidas sobre filtros *transwell*

marcadas con anticuerpo anti-gp135 (una glicoproteína presente sólo en membrana apical) o anti-p58 (exclusiva de la basolateral) [57].

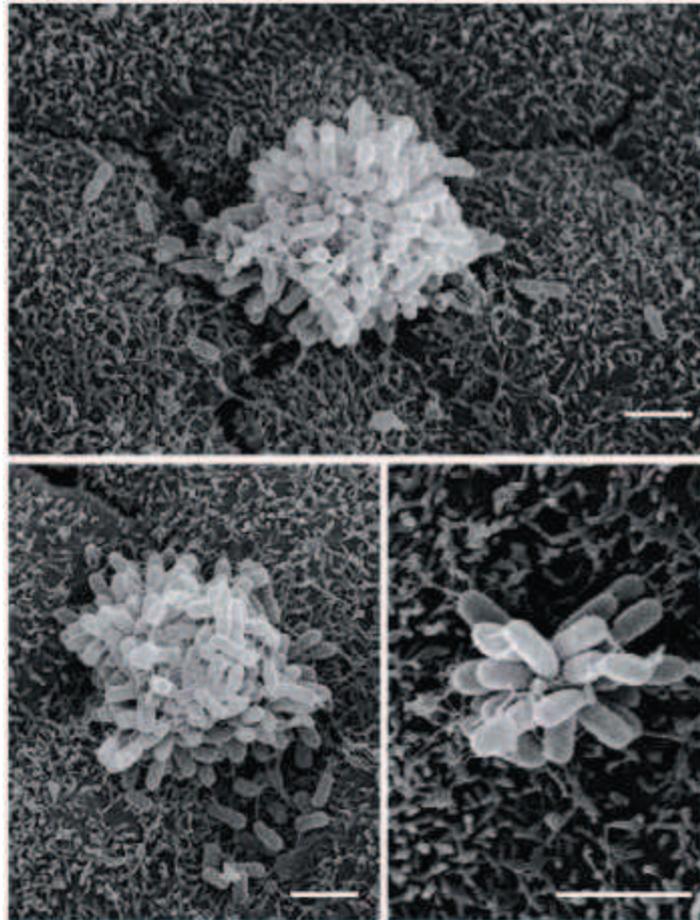


**Figura 1.5. Monocapas de células epiteliales MDCK.** Se muestran proyecciones de planos XY a lo largo del eje Z (plano XY) y proyecciones del eje X a lo largo del eje Z (plano XZ). Se visualizan claramente los patrones distintivos de la superficie apical y basolateral marcadas por las proteínas gp135 y p58, respectivamente, lo que indica que las células están polarizadas.

Estas células han sido utilizadas repetidamente en la literatura como modelo de células polarizadas en estudios de interacción con bacterias [58–64].

### 1.12. Antecedentes de nuestro grupo

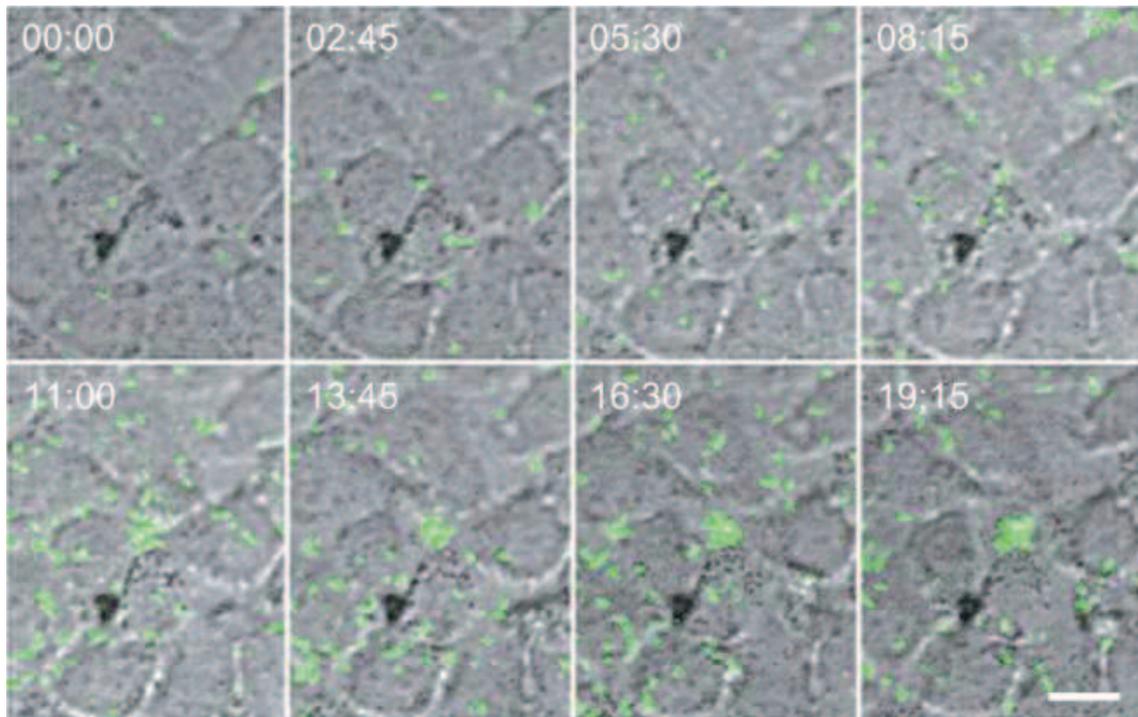
Nuestro grupo de trabajo estudia la interacción de *P. aeruginosa* con la barrera epitelial. Realizando infecciones sobre monocapas de células epiteliales polarizadas observamos que *P. aeruginosa* se adhiere a la misma principalmente en forma de agregados (Figura. 1.6).



**Figura 1.6. *P. aeruginosa* adhiere sobre células polarizadas formando agregados.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de agregados de *P. aeruginosa* sobre la superficie apical de células MDCK. Barra de escala 2  $\mu$ m. Figura adaptada de *Lepanto et. al.* (2011) [65].

A partir de distintos estudios determinamos que los agregados se forman *de novo* sobre la superficie epitelial, y que dicho proceso ocurre en forma secuencial y en el orden de minutos, a través del reclutamiento de bacterias que nadan activamente impulsadas por el flagelo [65]. La Figura 1.7 muestra una secuencia de imágenes, tomadas de un video, en donde se ve el proceso de formación de un agregado sobre la superficie de células epiteliales.

Observamos además que la agregación ocurre en sitios muy localizados de la superficie epitelial y que prácticamente no hay adhesión en otras áreas. Este mecanismo de agregación no está mediado por la multiplicación bacteriana y es sumamente rápido. Bacterias que nadan activamente se inmovilizan al adherirse a zonas puntuales de la superficie epitelial, se generan uniones bacteria-epitelio y bacteria-bacteria, formándose agregados esféricos y conspicuos cuyo crecimiento es limitado.

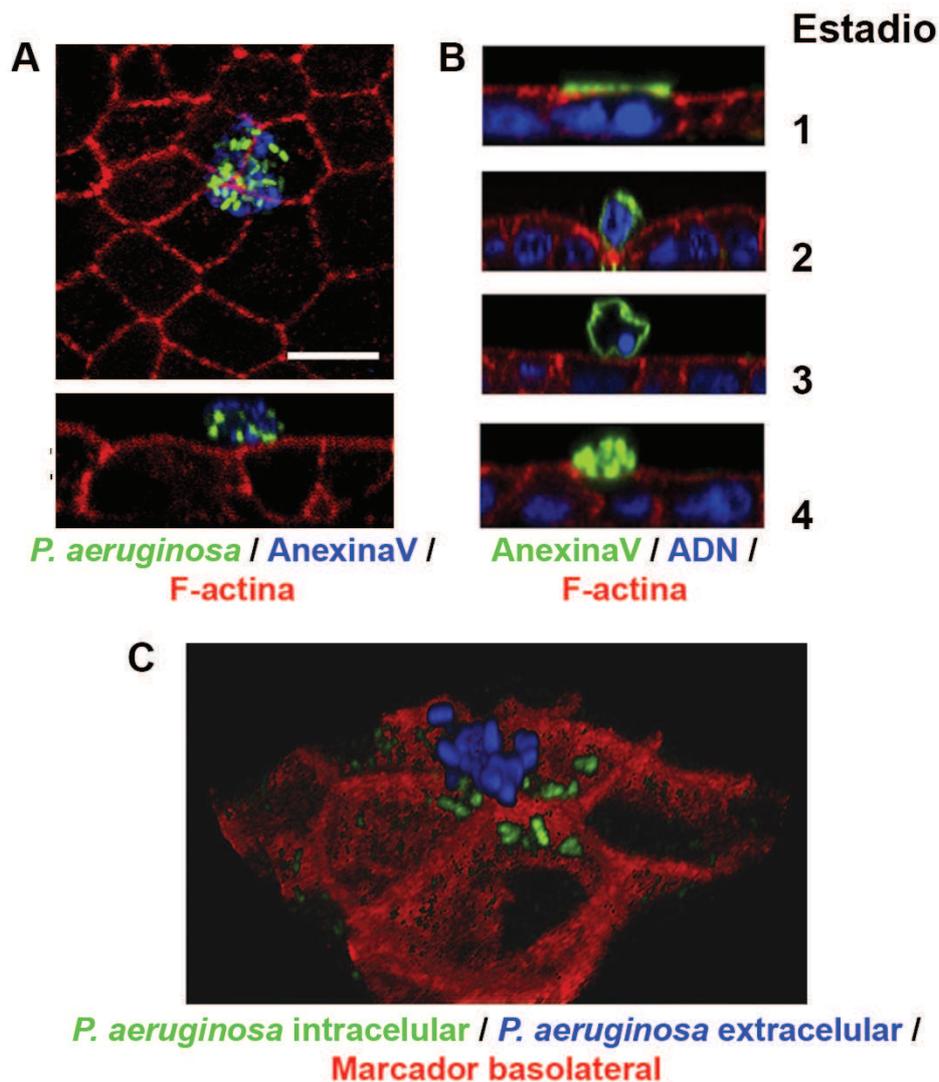


**Figura 1.7. La formación de agregados de *P. aeruginosa* ocurre *de novo* sobre la superficie epitelial, en forma secuencial y en el orden de minutos.** Imágenes a distintos tiempos, provenientes de una videomicroscopía representativa. Células epiteliales polarizadas se infectaron con *P. aeruginosa* expresando GFP (verde). En las imágenes se observa la monocapa de células epiteliales en campo claro. Barra de escala 10  $\mu\text{m}$ . El tiempo en el que fue adquirida cada imagen está indicado en minutos:segundos. Figura adaptada de Lepanto *et al.* (2011) [65].

Nuestros resultados muestran que los eventos de adhesión/agregación ocurren sobre las uniones célula-célula, particularmente en sitios de multiuniones formadas por cuatro o más células. Como mencionamos, estas multiuniones se pueden formar como consecuencia de la extrusión de células apoptóticas. A partir de distintas aproximaciones experimentales, pudimos establecer que, al interactuar con la barrera epitelial, *P. aeruginosa* se adhiere y agrega sobre células apoptóticas extruidas, que se encuentran sobre sitios de multiuniones celulares (Figura 1.8A) [66]. Vimos que las células apoptóticas a las cuales se unen las bacterias tienen características particulares, por lo que elaboramos una categorización de estas, dividiéndolas en 4 estadios. En el estadio 1, la célula apoptótica se encuentra insertada en la monocapa y presenta marca apical de anexina. En el estadio 2 la célula apoptótica se encuentra extruyéndose, puede verse el anillo de actina presente en la interfaz entre las células viables adyacentes y la célula apoptótica. En el estadio 3 la célula apoptótica se observa

totalmente fuera de la monocapa pero aún se aprecia el contorno definido de la membrana, así como la región intracelular. Finalmente, el estadio 4 corresponde a células apoptóticas, también por fuera de la monocapa, que parecen estar colapsadas y separadas en cuerpos apoptóticos. En este estadio no es posible apreciar la presencia de ADN ni una clara región intracelular. Consideramos que se trata de un estadio tardío en el proceso de apoptosis (Figura 1.8 B). El 72,3% de las bacterias se adhiere a células apoptóticas en estadio 4 [66].

Una vez formado el agregado, las bacterias pueden ser rápidamente internalizadas dentro de las células epiteliales que forman la multiunión en forma dependiente de PI3K (Figura 1.8 C) [67].



**Figura 1.8. *P. aeruginosa* se adhiere a células apoptóticas extruídas y es internalizada dentro de las células epiteliales de la multiunión.** A) Proyección de planos XY en el eje Z (arriba) y plano ortogonal (abajo) que muestran un agregado de *P. aeruginosa* formado sobre una célula apoptótica extruída. Barra de escala 10  $\mu$ m. B) Distintos estadios del proceso de apoptosis. A y B Figuras adaptadas de Capasso *et al.* (2016). C) Reconstrucción tridimensional de un agregado formado sobre una multiunión celular, parcialmente internalizado. Figura adaptada de Lepanto *et al.* [68].

A lo largo de esta tesis se profundizó en el estudio de la interacción de *P. aeruginosa* con células epiteliales. En particular se caracterizaron en detalle las células apoptóticas a las que se unen las bacterias y se estudió su influencia en la dinámica del proceso de agregación y en la estructura final del agregado. También se indagó en el mecanismo de internalización y destino intracelular de la bacteria.

# OBJETIVOS

## 2. Objetivos

Como mencionamos, en estudios previos del laboratorio se determinó que *P. aeruginosa* se adhiere a monocapas de células epiteliales polarizadas, formando agregados sobre células apoptóticas extruidas y que las bacterias contenidas en estos agregados pueden ser internalizadas por las células de la monocapa. El objetivo general de este trabajo es estudiar la interacción de *P. aeruginosa* con la barrera epitelial.

Nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- i) Caracterizar las células apoptóticas a las cuales *P. aeruginosa* se adhiere.
- ii) Estudiar las etapas iniciales de la formación de agregados de *P. aeruginosa*
- iii) Estudiar el mecanismo por el cual *P. aeruginosa* es internalizada dentro de células epiteliales polarizadas.
- iv) Determinar el destino intracelular de *P. aeruginosa*.

# RESULTADOS

### **3. Caracterización de las células a las cuales se une *P. aeruginosa* y dinámica del proceso de adhesión**

En estudios previos de nuestro grupo, vimos que los agregados de *P. aeruginosa* se forman principalmente sobre células apoptóticas que se encuentran en lo que denominamos estadio 4 de apoptosis, que corresponde a células totalmente extruidas de la monocapa, escindidas en cuerpos apoptóticos y que, en preparados de células fijadas, se ven colapsadas y no es posible apreciar una región interna, delimitada por membrana celular [66]. Estas características sugieren que se trata de células apoptóticas tardías. Debido a la marcada preferencia de las bacterias por estas células, la cual se evidencia desde los momentos iniciales de la infección, nos propusimos caracterizarlas en más detalle. Por otro lado, también se estudió la dinámica de la etapa inicial de la formación de agregados y su estructura en los primeros minutos de infección. Como se describió en la introducción, nuestro grupo de investigación reportó que *P. aeruginosa* se adhiere a monocapas de células epiteliales polarizadas formando agregados, los cuales se generan *de novo*, en forma secuencial y en el orden de minutos [65]. En esta tesis se estudió la formación de agregados utilizando una técnica de videomicroscopía confocal que permite seguir este proceso al nivel de bacterias individuales con alta resolución temporal. El registro temporal de comportamientos individuales devela información relevante, que es inaccesible en estudios a nivel del conjunto de la población.

#### **3.1. Descripción del modelo de trabajo.**

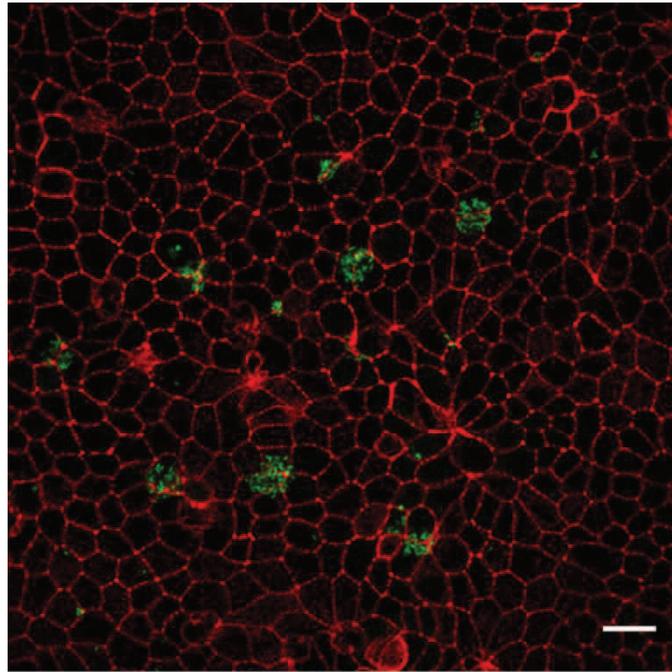
A lo largo de esta tesis se estudió la interacción de *P. aeruginosa* con células epiteliales polarizadas. Utilizamos la línea celular Madin Darby Canine Kidney (MDCK) de túbulo colector renal de perro. Como se mencionó en la introducción, estas células han sido usadas repetidamente como modelo de células polarizadas en estudios de interacción con bacterias [58–64]. Los experimentos se llevaron adelante principalmente con la cepa de *P. aeruginosa* K (PAK). Rutinariamente en nuestro laboratorio, sembramos las células eucariotas en soportes permeables conocidos como filtros *transwell*, donde las incubamos por 48 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células crecidas mediante este sistema se polarizan,

diferenciándose una cara apical y una basolateral. En todos los casos la infección se realizó por la cara apical.

Para la caracterización de las células apoptóticas a las que se une *P. aeruginosa*, se usó el sistema de células crecidas en filtros transwell y una multiplicidad de infección de 60 (MOI 60). Se adquirieron imágenes de microscopía confocal de fluorescencia (magnificación=60X) a una velocidad de 4  $\mu$ segundos/píxel, una resolución de 1024x1024 píxeles y una separación entre planos focales de 0,25  $\mu$ m cuando se trabajó con muestras fijadas. Cuando se trabajó con muestras sin fijar (como detallaremos más adelante, esto fue necesario por las características de los reactivos utilizados) se modificaron los parámetros para aumentar la velocidad de adquisición: velocidad de 2  $\mu$ segundos/píxel, resolución de 800x800 píxeles y una separación de 0,30  $\mu$ m. Para la adquisición de imágenes, se eligieron campos recorriendo la muestra de manera sistemática, de forma tal de representar todas las zonas del preparado. Se tomaron un total de 10 campos por muestra, cada una de los cuales contiene aproximadamente 350 células. El número promedio de agregados de bacterias que se forman por campo es de  $5,00 \pm 0,40$  [69]. En la Figura 3.1 puede verse un campo típico de células MDCK infectadas con PAK-GFP. Las células están marcadas con faloidina-rodamina, que es capaz de unirse a la actina polimerizada.

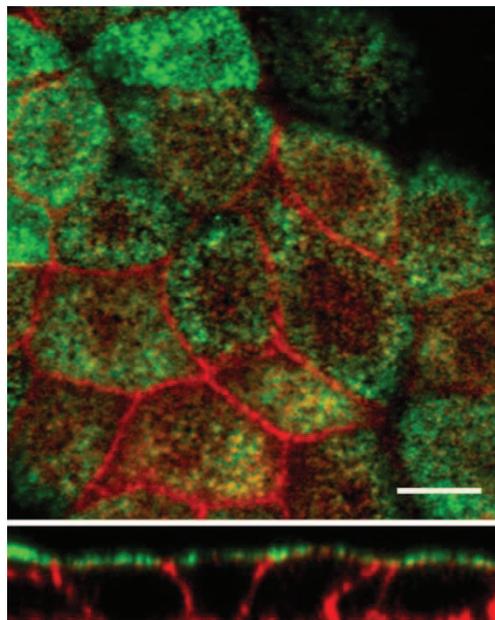
Para estudiar la dinámica de la formación de agregados, y su estructura en los primeros minutos de pegado de las bacterias, las imágenes fueron adquiridas durante el proceso de infección. Para ello se crecieron células MDCK en placas de cultivo de 35mm con fondo de vidrio. Las células se incubaron por 72 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Durante este tiempo no se realizó recambio del medio de cultivo, para permitir la polarización [70]. La efectividad del protocolo, se corroboró mediante la marcación con un anticuerpo que reconoce a la proteína gp135, de localización exclusivamente apical en células polarizadas [57] (Figura 3.2).

Previo a la infección, las células apoptóticas extruidas se marcaron con AnexinaV-Alexa647. La AnexinaV es una proteína capaz de reconocer la



PAK-GFP / F-actina

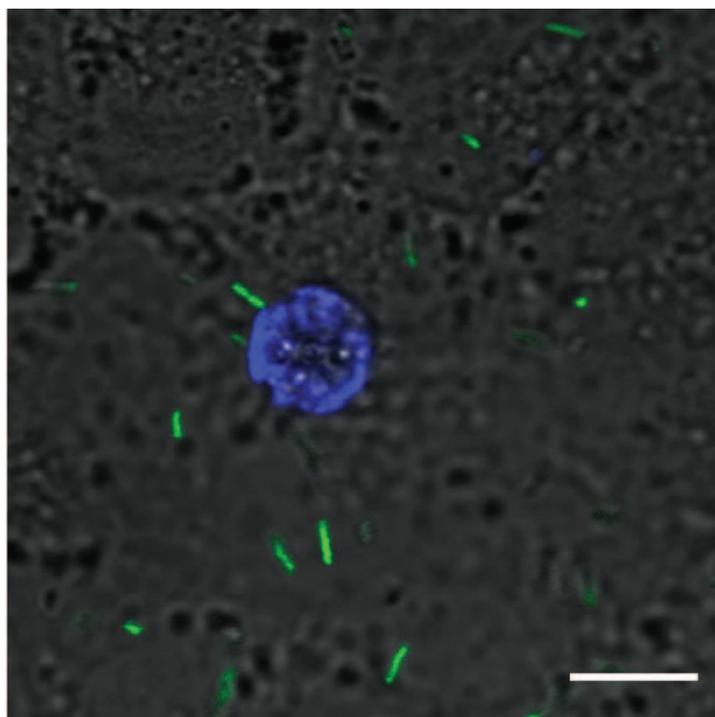
**Figura 3.1. Monocapa de células MDCK infectadas con *P. aeruginosa*.** Las células se ven rojo y PAK-GFP se ve en verde. Proyección XY. Barra de escala 20  $\mu\text{m}$



gp135 / F- actina

**Figura 3.2. Polarización de células crecidas sobre vidrio.** Células MDCK crecidas sobre vidrio por 72 hs, marcadas con anticuerpo anti-gp135 (verde) y faloidina (rojo). Proyección XY arriba y reconstrucción ortogonal XZ abajo. Barra de escala 10  $\mu\text{m}$

fosfatidilserina expuesta en las células apoptóticas. Las imágenes se registraron por videomicroscopía confocal. (velocidad: 2  $\mu$ segundos/píxel, resolución: 800x800 píxeles). En todos los experimentos de videomicroscopía confocal se utilizó una MOI 20. La Figura 3.3 muestra un campo típico donde puede verse una célula apoptótica segundos después de realizar la infección con PAK-GFP.



**PAK-GFP / AnexinaV / monocapa de MDCK**

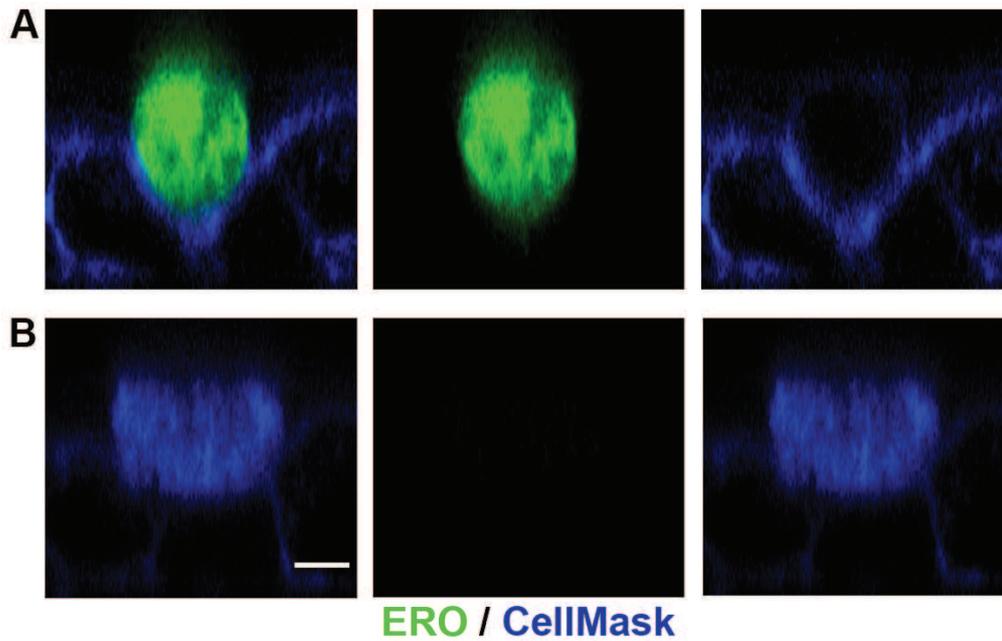
**Figura 3.3. Videomicroscopía de células infectadas con *P. aeruginosa*.** Células MDCK marcadas con AnexinaV-Alexa647 (azul) y luego infectadas con PAK-GFP (verde). En gris se ve el campo claro. Plano XY que corresponde al primer tiempo del video. Barra de escala 10  $\mu$ m

### **3.2. *P. aeruginosa* se une a células apoptóticas con bajo contenido de especies reactivas de oxígeno.**

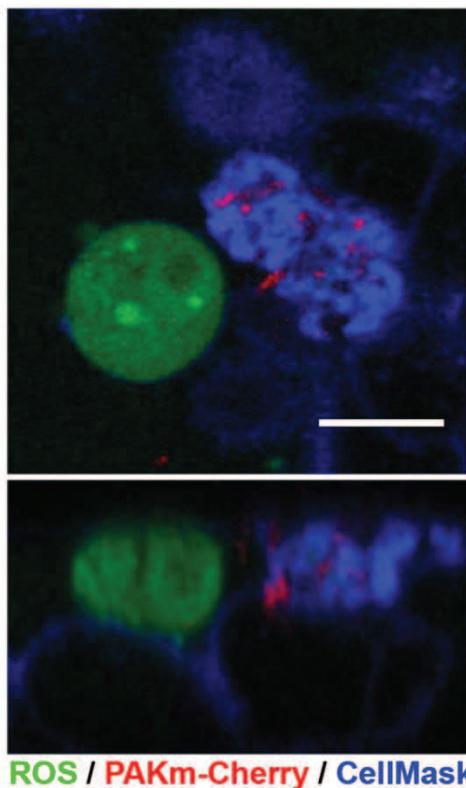
Como mencionamos anteriormente, *P. aeruginosa* se une preferentemente a células apoptóticas en estadio 4, el cual creemos que corresponde a células apoptóticas tardías. Para evaluar si efectivamente la bacteria se adhiere muy infrecuentemente a células en estadios tempranos de apoptosis, utilizamos un marcador de estas etapas. Como se dijo en la introducción, la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) es un evento temprano en el proceso de apoptosis. Decidimos evaluar el contenido de ERO en las células apoptóticas de

cultivos de células MDCK con 2',7' –diclorofluoresceína diacetato (DCFDA), también conocido como H<sub>2</sub>DCFDA, un reactivo no fluorescente que difunde dentro de las células. Cuando este reactivo es oxidado por ERO intracelular se genera 2', 7' –diclorofluoresceína (DCF), que es un compuesto altamente fluorescente. Las células fueron lavadas y el medio se reemplazó por medio de cultivo con H<sub>2</sub>DCFDA. Se incubó por 20 minutos a 37°C y 5%CO<sub>2</sub> y luego se agregó CellMask (una tinción que marca la membrana plasmática sin la necesidad de fijar o permeabilizar la muestra) y se incubó por 10 minutos junto con H<sub>2</sub>DCFDA. Finalmente, el preparado se montó sin fijar (ya que este reactivo no es compatible con los procesos de fijación) y se observó inmediatamente en el microscopio. En la Figura 3.4 se ve una monocapa de células MDCK sin infectar que fue incubada con H<sub>2</sub>DCFDA y CellMask. Puede observarse que la marcación con DCF distingue claramente las células apoptóticas tempranas de las tardías. Una célula en proceso de extrusión (estadio 2) presenta una marcación intensa con DCF (Figura 3.4A). Por el contrario, una célula en estadio 4 presenta muy baja fluorescencia (Figura 3.4B)

Para poner a prueba la hipótesis de que las células apoptóticas a las cuales se une *P. aeruginosa* poseen un bajo contenido de ERO intracelular, monocapas de células MDCK crecidas sobre filtros transwell fueron infectadas con PAK-mCherry. Las células luego fueron lavadas y marcadas con H<sub>2</sub>DCFDA y CellMask (Figura 3.5). Se comparó la intensidad de fluorescencia de DCF entre células apoptóticas que tenían bacterias adheridas frente a las que no en un mismo cultivo. Se determinó que las células que no poseían bacterias tenían, en promedio, una intensidad de fluorescencia  $14,32 \pm 6,75$  veces mayor que las que si poseían.



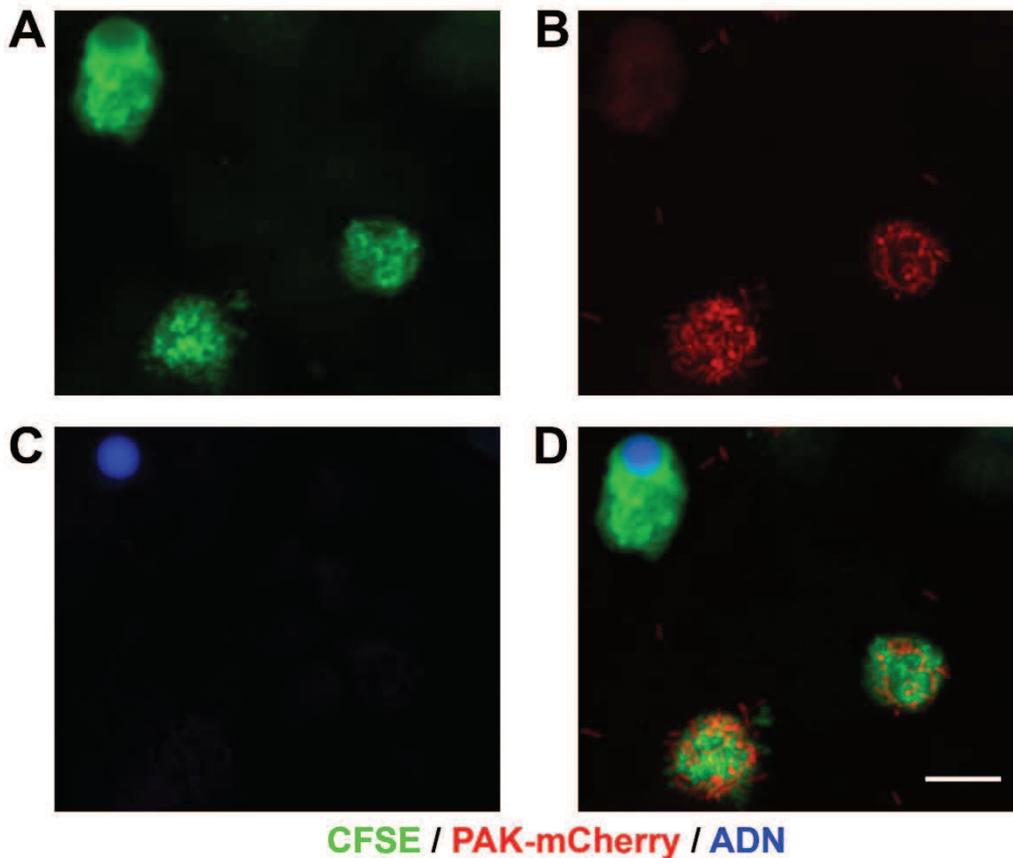
**Figura 3.4.** El contenido de ERO distingue a las células apoptóticas tempranas de las tardías. Reconstrucciones ortogonales XZ donde puede verse una célula apoptótica temprana (A) y otra tardía (B). DCF (verde), CellMask (azul). Barra de escala 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 3.5.** *P. aeruginosa* se une a células con bajo contenido de ERO. Plano XY (arriba) y reconstrucción ortogonal XZ (abajo) de una monocapa infectada con PAK-mCherry y teñida con H<sub>2</sub>DCFDA. Se observa una célula apoptótica temprana a la izquierda y una tardía a la derecha. ERO (verde), PAK-mCherry (rojo) CellMask (azul). Barra de escala 10  $\mu\text{m}$ .

### **3.3. Las células apoptóticas a las que se une *P. aeruginosa* no presentan ADN intracelular**

En estadios tardíos de la apoptosis, luego de la permeabilización de la membrana plasmática, se verifica una disminución del contenido de ADN de la célula, en parte debido a la liberación de cuerpos apoptóticos, en los cuales puede quedar contenida cromatina, y también por la acción de DNAsas presentes en el suero del medio con el que las células están en contacto [36]. Así, la pérdida del ADN es un marcador de apoptosis tardía. Nos propusimos entonces evaluar el contenido de ADN en células apoptóticas con y sin bacterias adheridas, en un mismo cultivo. Para ello se utilizaron células MDCK crecidas en filtros transwell que fueron teñidas con éster de succinimidil-carboxifluoresceína diacetato, una molécula permeable, no fluorescente, que una vez internalizada dentro de la célula, es clivada por esterasas produciendo una molécula verde fluorescente (CFSE). Esta molécula se une covalentemente a las proteínas intracelulares, permitiendo visualizar las células mediante microscopía de fluorescencia. Las células viables se distinguen de las células apoptóticas, ya que éstas últimas (a partir del estadio 2) están ubicadas en un plano superior, por encima de las células de la monocapa. El cultivo de células marcadas con CFSE se infectó con PAK-mCherry por 1 h y luego se fijó y permeabilizó. Finalmente, se tiñó con TO-PRO3 (una sonda fluorescente que se une a ADN) y se evaluó por microscopía confocal. En la Figura 3.6 se observa que las bacterias se adhieren a células apoptóticas que no presentan marcación con TO-PRO3, mientras que no hay bacterias sobre la célula que presenta una marca intensa para ADN. Puede verse que en este caso el ADN se encuentra condensado (pignosis), lo cual es característico del proceso de apoptosis. Determinamos que, del total de las células apoptóticas, sólo el 17,65% presentan marca intracelular con TO-PRO3, sin embargo, el 76,92% de las células que no poseen bacterias adheridas, presentan esta marca, lo que sugiere que las bacterias se adhieren con menos frecuencia a células apoptóticas que poseen ADN intracelular.



**Figura 3.6.** *P. aeruginosa* se une a células con bajo contenido de ADN. Proyección XY de una monocapa de células MDCK infectada con PAK-mCherry donde se ven 3 células apoptóticas. A) CFSE (verde), B) PAK-mCherry (rojo), C) TO-PRO3 (azul), D) superposición de los tres canales. Barra de escala 10  $\mu$ m.

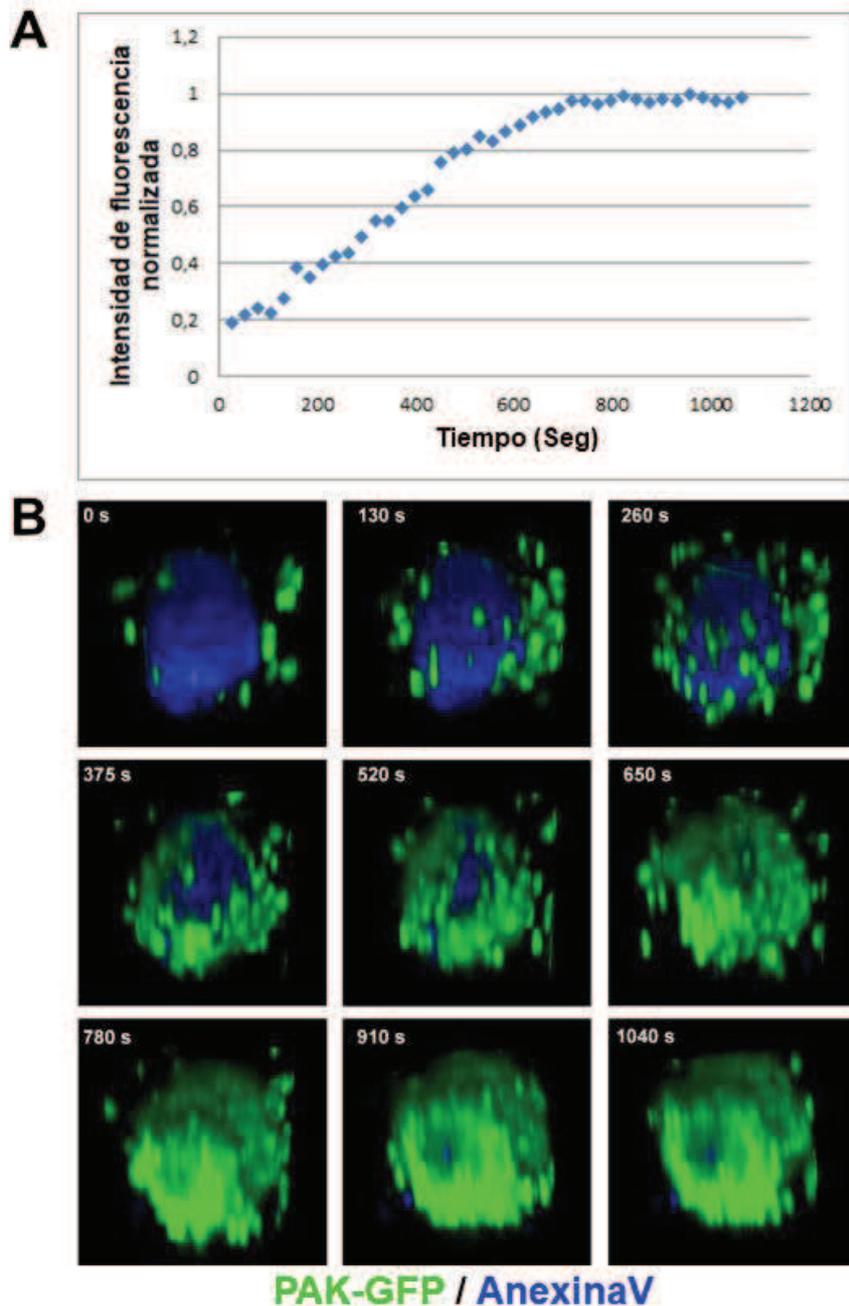
Concluimos que las células a las que se une *P. aeruginosa* están en un estadio de apoptosis avanzado y que prácticamente no se verifica adhesión a células en estadios tempranos.

#### 3.4. Estudio de la dinámica de la formación de agregados de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas

Las bacterias son capaces de formar complejas estructuras multicelulares, las cuales resultan clave a la hora de colonizar al hospedador. La etapa inicial en su formación, la transición desde un estado planctónico a uno multicelular y asociado a superficie, es particularmente poco comprendida ya que son escasos los modelos disponibles para estudiar esta transición en profundidad, especialmente en el contexto de la interacción con las células hospedadoras. El seguimiento en tiempo real del posicionamiento individual de cada bacteria

durante el proceso de formación del agregado podría ayudar a entender cómo influye la interacción coordinada bacteria-epitelio y bacteria-bacteria en la organización global del sistema.

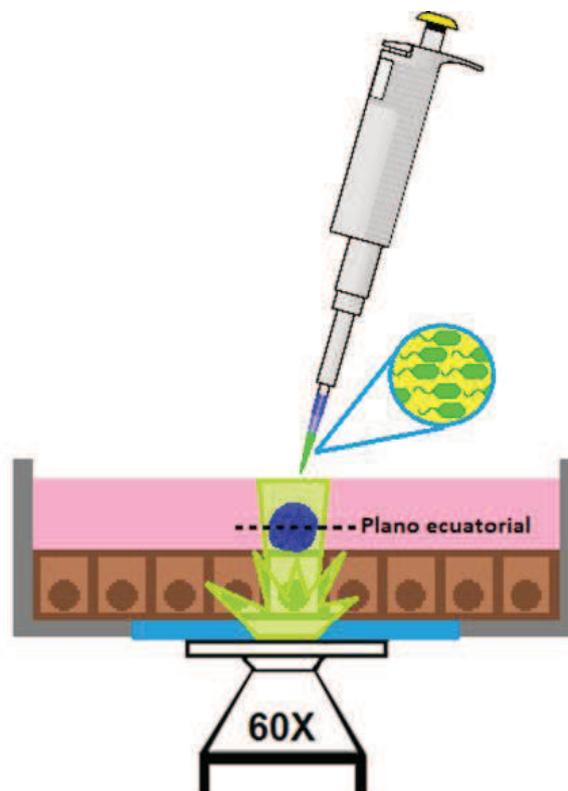
En estudios previos del laboratorio, realizados mediante videomicroscopía confocal en células sin fijar, registramos la formación de los agregados en 3 dimensiones: se adquirieron planos xy a lo largo del eje z (stack de imágenes) abarcando todo el volumen de la célula apoptótica, generando stacks sucesivos a lo largo del tiempo (xyzt). A partir de estos datos, estudiamos la cinética de incorporación de bacterias al agregado y vimos que existe una fase de crecimiento seguida por una fase donde el número de bacterias se mantiene estable (Figura 3.7A). Utilizando los stacks de imágenes, realizamos reconstrucciones tridimensionales en donde pudimos apreciar que las bacterias son capaces de cubrir casi por completo la superficie de la célula apoptótica en los primeros 15 minutos de infección (Figura 3.7B) [69].



**Figura 3.7. Dinámica de la formación de un agregado.** A) Ejemplo de una curva de intensidad de fluorescencia normalizada en función del tiempo. Cada punto representa la intensidad de fluorescencia integrada de todo el agregado para un tiempo determinado. B) Reconstrucción 3D de distintos momentos de la formación de un agregado. PAK-GFP (verde) y célula apoptótica marcada con AnexinaV-Alexa647 (azul) [69].

Para estudiar la dinámica del proceso de agregación de las bacterias con alta definición temporal realizamos la adquisición de imágenes en un solo plano. Como mencionamos, para estos experimentos las células MDCK se crecieron en placas de cultivo con fondo de vidrio. Antes de realizar la infección, las células

se tiñeron con AnexinaV-Alexa647 y, una vez marcadas, fueron colocadas en el microscopio confocal. Se eligió una célula apoptótica extruida y se enfocó su plano ecuatorial, es decir, el plano que la divide a la mitad. Luego se procedió a realizar la infección, para lo cual, se tomó como guía el haz de luz del microscopio y se dejó caer la gota de cultivo bacteriano sobre el área iluminada (Figura 3.8). Inmediatamente después comenzó la adquisición de imágenes sucesivas del plano ecuatorial durante aproximadamente 15 minutos. Se tomaron 800 imágenes del plano (tiempo de adquisición por plano 1,11 segundos). Así, cada imagen representa un tiempo particular (Frame).



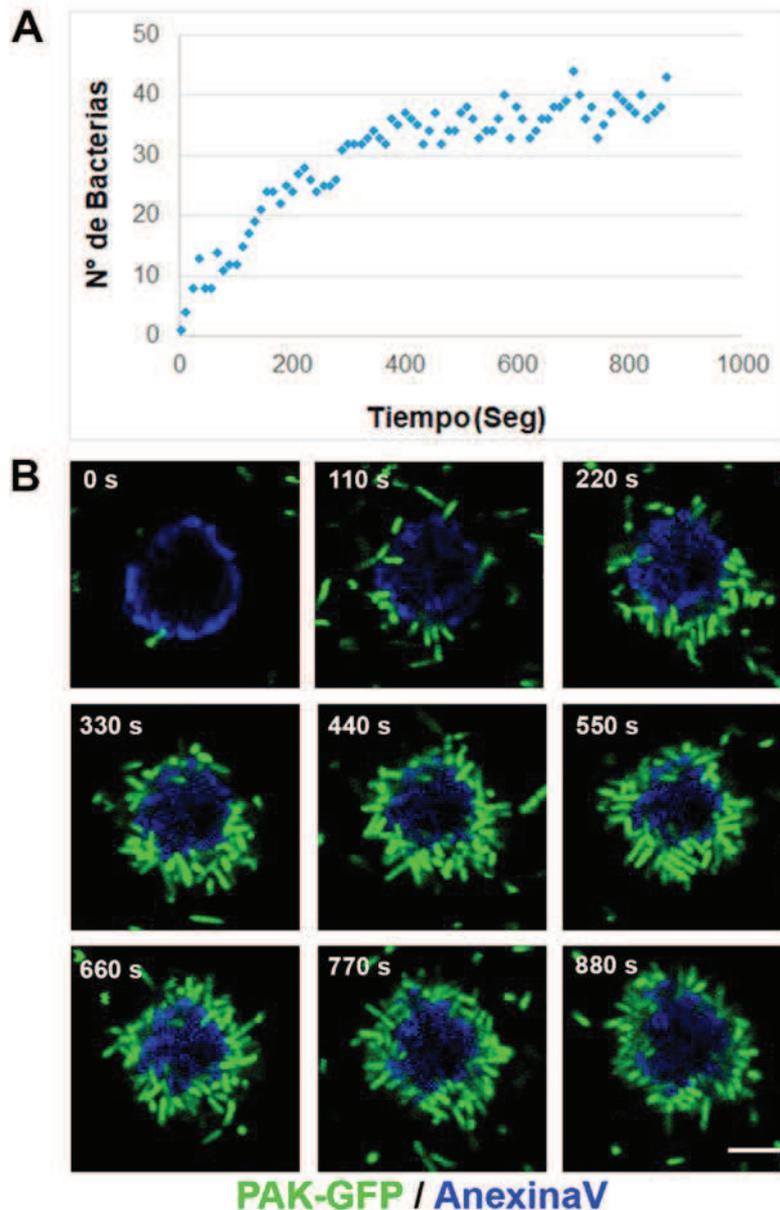
**Figura 3.8. Protocolo de infección.** Esquema ilustrativo del protocolo de infección con PAK de células MDCK crecidas sobre placas con fondo de vidrio.

Nos propusimos indagar en las siguientes cuestiones: ¿Cómo es la dinámica del proceso de adhesión de las bacterias individuales a la célula apoptótica? y ¿Cómo es la distribución espacial de las bacterias sobre la célula a lo largo del tiempo? Para responder la primera pregunta se cuantificó el número de bacterias adheridas a la célula apoptótica para cada tiempo registrado, no se tuvieron en cuenta las bacterias adheridas a otras bacterias (Figura 3.9A). El análisis del crecimiento del agregado a nivel de un único plano muestra el mismo resultado

que cuando se estudia la formación del agregado en la célula completa: se observa una etapa inicial de crecimiento, seguida por una saturación del número de bacterias adheridas. En la Figura 3.9B se ven imágenes representativas del crecimiento de un agregado a nivel del plano ecuatorial. Puede verse que el número de bacterias se estabiliza cuando la superficie de la célula apoptótica en ese plano está completamente cubierta. De esta forma, la dinámica de formación de un agregado en 3 dimensiones se ve representada por lo que ocurre en un único plano. Este protocolo de adquisición de imágenes nos permite obtener una alta resolución temporal, lo que posibilita el seguimiento de bacterias individuales, permitiéndonos estudiar en detalle la dinámica de formación del agregado y su estructura a lo largo del tiempo.

Estudiar la distribución espacial inicial de *P. aeruginosa* en el agregado es importante para entender en qué se basa la interacción de la bacteria con el sustrato, o la forma en que las bacterias interactúan entre sí. Por ejemplo, puede ayudar a indagar sobre qué tipo de adhesinas están interviniendo, o si existe o no cooperatividad entre bacterias. Nos propusimos entonces, analizar la orientación con la que las bacterias se adhieren a la célula. En una primera instancia, contamos el número de bacterias que se unen por un extremo a la célula (Figura 3.10, panel izquierdo, asteriscos) y el número de bacterias que parecen estar acostadas sobre la superficie (Figura 3.10, panel izquierdo, rombo). Calculamos que el 95,86% de las bacterias se adhieren por un extremo. Para profundizar en este resultado, medimos el ángulo entre el eje más largo de la bacteria y la tangente a la superficie de la célula apoptótica para las bacterias adheridas en el último plano de cada video. Sólo se tuvieron en cuenta aquellas bacterias que se vieran enteras, es decir, que estuvieran en foco y en el plano ecuatorial (Figura 3.10, panel derecho). Se vio que el 93,18% de las bacterias adheridas están en un ángulo entre  $45^\circ$  y  $135^\circ$ , lo que confirma que la zona de contacto de la bacteria con la célula apoptótica sería principalmente el extremo. Este análisis se hizo a partir de 5 videos independientes. Este dato es relevante ya que esta disposición espacial permitiría acomodar un gran número de bacterias sobre la superficie. Sugiere, además, que la adhesina involucrada sería de localización polar. Es interesante notar que, en nuestros estudios anteriores, realizados sobre células fijadas, no se observa esta disposición espacial de las

bacterias, sino que las mismas parecen estar acostadas, de forma desorganizada, sobre la célula.



**Figura 3.9. Adhesión de *P. aeruginosa* a una célula apoptótica a lo largo del tiempo.** A) Ejemplo de una curva de adhesión de bacterias a una célula apoptótica en el plano ecuatorial. B) Imágenes representativas del crecimiento de un agregado. PAK-GFP (verde) unida a una célula apoptótica marcada con AnexinaV-Alexa647 (azul). La curva y las imágenes de microscopía pertenecen al mismo video. Barra de escala 5  $\mu$ m.

Esto puede deberse, en parte, a la evolución temporal de la estructura del agregado, ya que en los experimentos en que fijamos las células, la infección se realiza durante 1 h o más, y las videomicroscopías confocales, las realizamos en

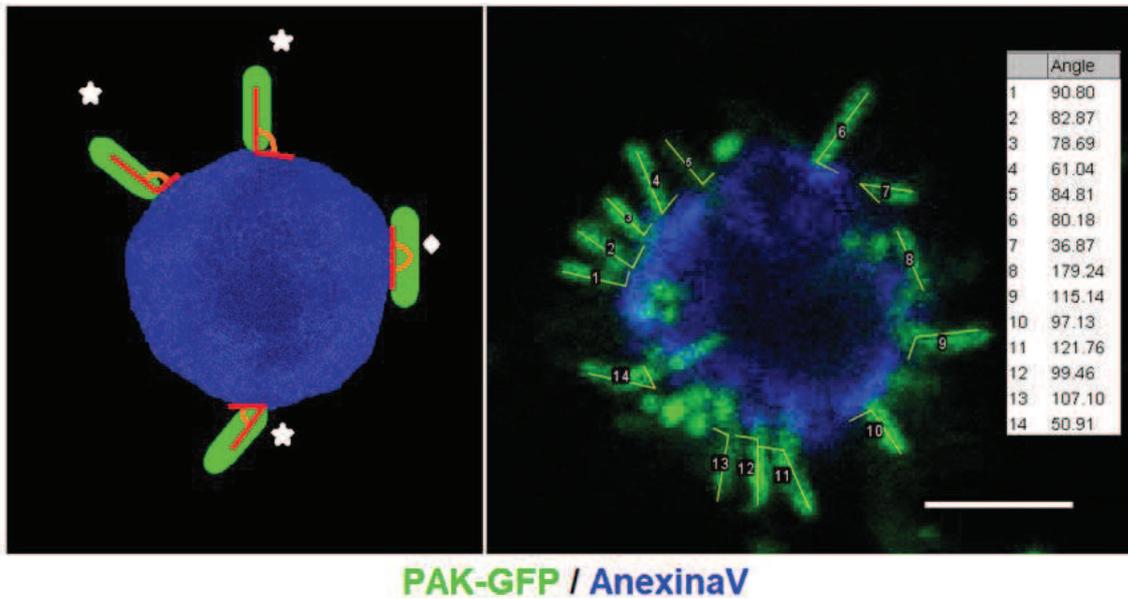
los primeros 15 minutos de infección. Sin embargo, también es posible, que la fijación, y los procesos posteriores, como la permeabilización, afecten la estructura del agregado. Hemos observado también, en experimentos de videomicroscopía que, las células apoptóticas a las que se unen las bacterias poseen una región intracelular claramente delimitada por la membrana plasmática, a diferencia de lo que describimos previamente [66], donde en preparados fijados, se ve que las células apoptóticas tardías están colapsadas, y no se distingue una región intracelular. Esto podría deberse a que las células en estadios avanzados de apoptosis son más sensibles a los procesos de fijado y permeabilización que las células apoptóticas tempranas. Esta observación destaca la importancia del desarrollo de protocolos con muestras sin fijar para el estudio de estas formaciones bacterianas multicelulares.

En otro tipo de análisis indagamos cómo varía la distribución espacial de las bacterias sobre la superficie de la célula apoptótica a lo largo del tiempo. Para este estudio se analizó 1 frame de cada 10. Se estableció, de manera manual (utilizando el programa ImageJ, Point Tool), la posición de cada bacteria individual: Se registraron las coordenadas espaciales (xy) de la zona de la bacteria que está en contacto con la célula y también se registró la posición del centro de masa de la célula en cada frame. Solo se tuvieron en cuenta las bacterias adheridas a la célula apoptótica, no se consideraron bacterias adheridas a otras bacterias.

En la Figura 3.11A se representa un ejemplo de la posición de las bacterias (círculos azules) y el centro de masa de la célula (cruz roja) en el último frame de un video típico, el cual se muestra en la Figura 3.11B. Con los datos registrados, dividimos la célula en porciones iguales a partir del centro de masa y graficamos el número de bacterias en cada porción a lo largo del tiempo, según una escala de color, lo cual se muestra en la Figura 3.11C. Para realizar este análisis elegimos células apoptóticas que al final del video estuvieran totalmente cubiertas de bacterias.

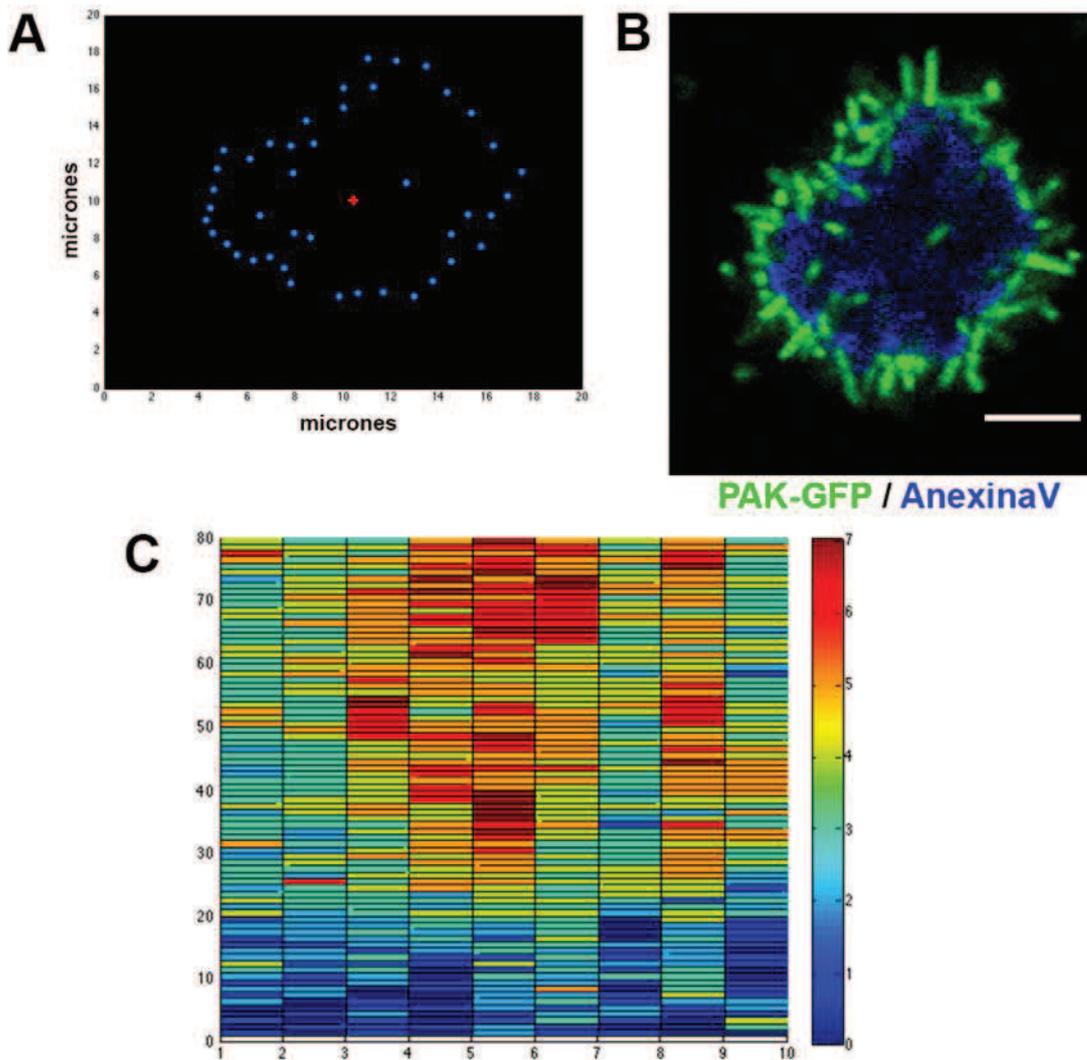
El video representado en la Figura 3.11 puede verse en el siguiente link:

<https://youtu.be/POItMHb43Jg>



**Figura 3.10. Orientación de *P. aeruginosa* adherida sobre la célula apoptótica.** A la izquierda se ve una representación gráfica de una célula apoptótica con bacterias adheridas. Los asteriscos marcan bacterias adheridas por un extremo, el rombo señala a una bacteria “acostada” sobre la célula apoptótica. En color rojo se marca el ángulo considerado para el análisis. A la derecha se ve un ejemplo de un plano en el cual se midió el ángulo de contacto de las bacterias con la célula apoptótica. La célula apoptótica marcada con AnexinaV-Alexa647 se ve en azul, PAK-GFP se ve en verde. Barra de escala 5  $\mu\text{m}$ .

Se observa que en la superficie celular hay regiones que son capaces de albergar más bacterias que otras. Es decir, si bien la superficie parece cubrirse completamente, hay zonas donde la densidad es mayor. Además, vemos que en esas regiones las bacterias comienzan a adherirse antes. Esto podría deberse a que las bacterias tienden a unirse allí donde ya hay otras bacterias. Pero también, y esto no es excluyente, podría ocurrir que las distintas zonas de la superficie celular sean diferentes, poseyendo distinta composición o estructura. Podemos especular que cada zona particular de la célula presenta parches con distintas moléculas expuestas, las cuales pueden resultar más o menos atractivas para la bacteria. También podemos suponer que distintas regiones pueden tener diferente estructura, presentando mayor extensión, cavidades o invaginaciones, o incluso distinto grado de rugosidad o una topografía diferente, lo que puede ser relevante en la interacción entre las bacterias y la célula.

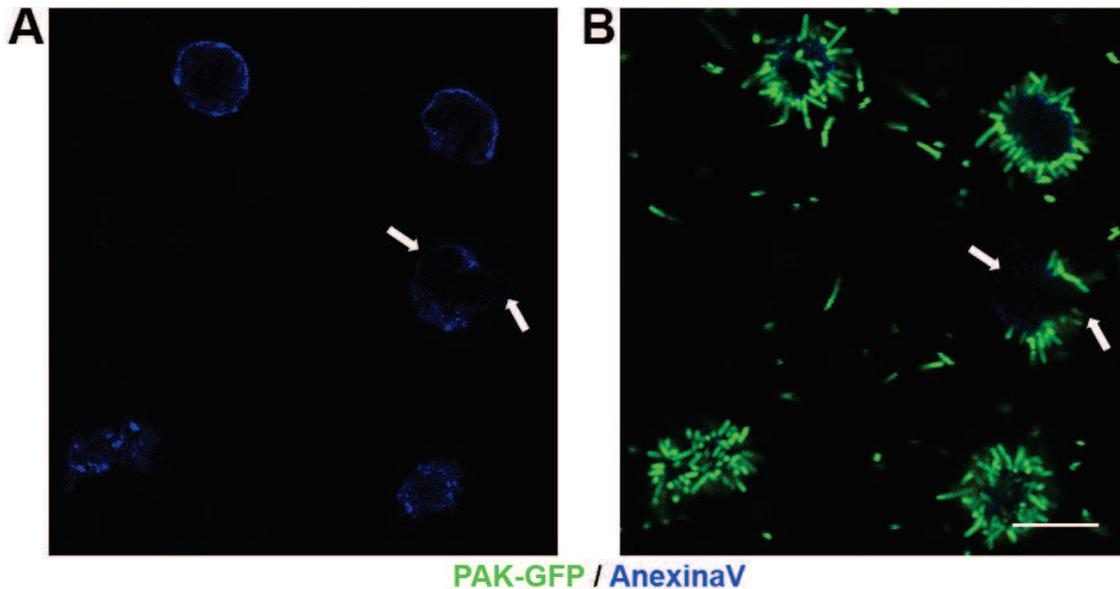


**Figura 3.11. Distribución de las bacterias sobre la célula apoptótica.** A) Ejemplo de la posición de las bacterias (círculos azules) y el centro de masa de la célula (cruz roja) en una célula apoptótica típica. B) La célula apoptótica marcada con AnexinaV-Alexa647 se ve en azul, PAK-GFP se ve en verde. Barra de escala 5  $\mu\text{m}$ . C). Representación gráfica del número de bacterias en las distintas porciones de una célula representativa a lo largo del tiempo. El número de bacterias está representado según la escala de colores. En el eje X se representan las porciones de la célula y en el eje Y el frame.

### 3.5. *P. aeruginosa* se une a células apoptóticas que presentan su superficie vesiculizada.

Si bien generalmente observamos que durante la formación de agregados la célula apoptótica se cubre por completo, vimos algunos casos en los que hay zonas de la superficie que no son colonizadas por las bacterias. En la Figura 3.12 puede verse un campo con varias células apoptóticas antes (panel A) y

después de 15 minutos de infección (panel B). En una de las células, se observan zonas que quedan sin bacterias adheridas (flechas blancas). Notamos además que en aquellas zonas donde no hay bacterias, la marcación a tiempo cero de AnexinaV-Alexa647 era mucho más tenue (panel A).

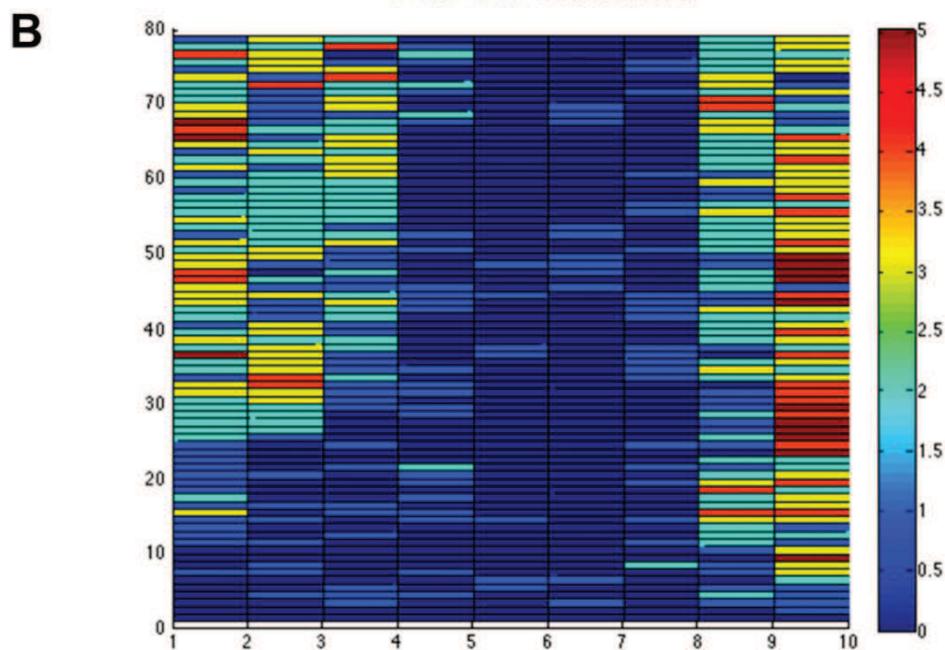
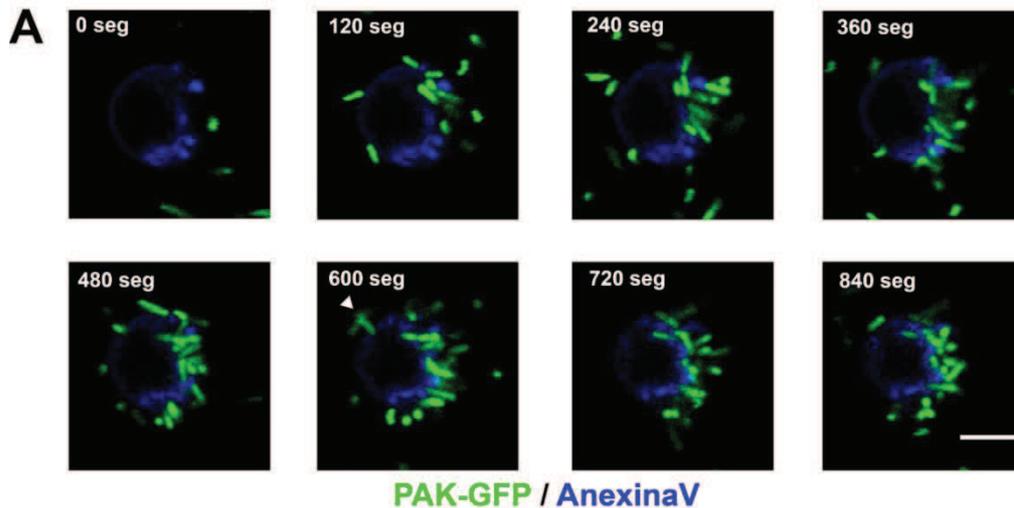


**Figura 3.12. Existen zonas en la célula apoptótica a las que *P. aeruginosa* no se adhiere.** A) Células apoptóticas marcadas con AnexinaV-Alexa647 (azul). Se observa una marcación tenue en los sitios indicados por las flechas blancas. Puede verse que PAK-GFP (verde) no se adhiere a estos sitios. (B). Barra de escala 10  $\mu$ m.

El mismo fenómeno está representado en la Figura 3.13A, donde se observa una distribución polarizada de *P. aeruginosa*, distinguiéndose una zona con un gran número de bacterias adheridas y otra zona donde éstas no se adhieren o sólo permanecen unidas a la célula durante tiempos cortos (triángulo blanco). La Figura 3.13B muestra la representación gráfica del número de bacterias en las distintas porciones de la célula a lo largo del tiempo.

El video representado en la Figura 3.13 puede verse en el siguiente link: <https://youtu.be/7-991-LKkBY>.

Podemos observar en el video que, en las zonas donde no se ve acumulación de bacterias, éstas contactan la superficie pero no permanecen adheridas por mucho tiempo.



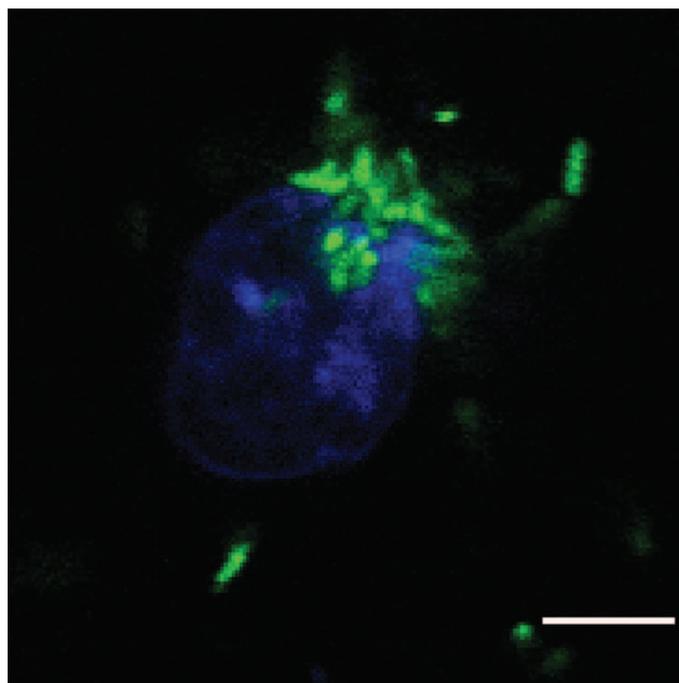
**Figura 3.13. Distribución polarizada de *P. aeruginosa* sobre una célula apoptótica.** A) Distintos momentos de la formación de un agregado sobre una célula apoptótica con una marca heterogénea de AnexinaV. La célula apoptótica marcada con AnexinaV-Alexa647 se ve en azul, PAK-GFP se ve en verde. Barra de escala 5  $\mu$ m. B). Representación gráfica del número de bacterias en las distintas porciones de una célula a lo largo del tiempo. El número de bacterias está representado según la escala de colores. En el eje X se representan las porciones de la célula y en el eje Y el frame.

Para cuantificar la observación de que los sitios que presentan mayor adhesión de bacterias tienen una marca de AnexinaV más intensa, se cuantificó el número de bacterias y la intensidad de fluorescencia de AnexinaV-Alexa647 en cada porción de la célula apoptótica y se estudió la correlación entre ambas. Se encontró que a mayor intensidad de la marca de AnexinaV-Alexa647, mayor es

el número de bacterias que se adhiere a la célula apoptótica (Coeficiente de correlación de Spearman;  $p < 0,05$ ).

La mayor intensidad de la marca de AnexinaV puede deberse a un número más alto de moléculas expuestas de fosfatidilserina o a que haya, en esa zona, una mayor superficie de membrana. Para distinguir entre ambas posibilidades se realizaron videos donde la membrana plasmática se marcó inicialmente con CellMask (en lugar de AnexinaV-Alexa647). Luego se buscaron células que poseyeran regiones con bacterias adheridas y zonas donde no había prácticamente adhesión. En la Figura 3.14 puede verse que el CellMask presenta un patrón similar al que encontramos con AnexinaV-Alexa647: las zonas sin bacterias correlacionan con zonas de baja tinción de CellMask y viceversa. Esto indica que en una zona donde la tinción es más intensa no habría una mayor exposición de fosfatidilserina sino más cantidad de membrana teñida.

Decidimos entonces estudiar la morfología de la membrana mediante microscopia electrónica de barrido. Para ello, se utilizaron células MDCK crecidas en filtros transwell, las cuales se dejaron sin infectar o fueron infectadas con PAK (MOI 60) durante 1 h. En la muestra sin infectar encontramos células apoptóticas extruidas con distintas morfologías. Vimos células que poseen una membrana lisa (Figura 3.15A) y células extruidas, cuya superficie parece estar totalmente vesiculizada (Figura 3.15B). En esta foto puede verse que gran parte de la superficie celular está cubierta de cuerpos apoptóticos de pequeño tamaño (aproximadamente  $0,1 \mu\text{m}$ ), aunque también pueden verse algunos más grandes (flecha negra). Si bien el tamaño con que habitualmente se describen los cuerpos apoptóticos es mayor a  $0,1 \mu\text{m}$ , en realidad la variedad de tamaños reportados es amplia y abarca magnitudes similares a las que encontramos en estas células [31,32]. En los casos en los que la monocapa celular fue infectada con PAK, se encontraron células extruidas con las mismas características (lisas y vesiculizadas). Sin embargo, sólo se vieron bacterias adheridas a las células que poseen su membrana vesiculizada (Figuras 3.15C-D). En la Figura 3.15C se ve



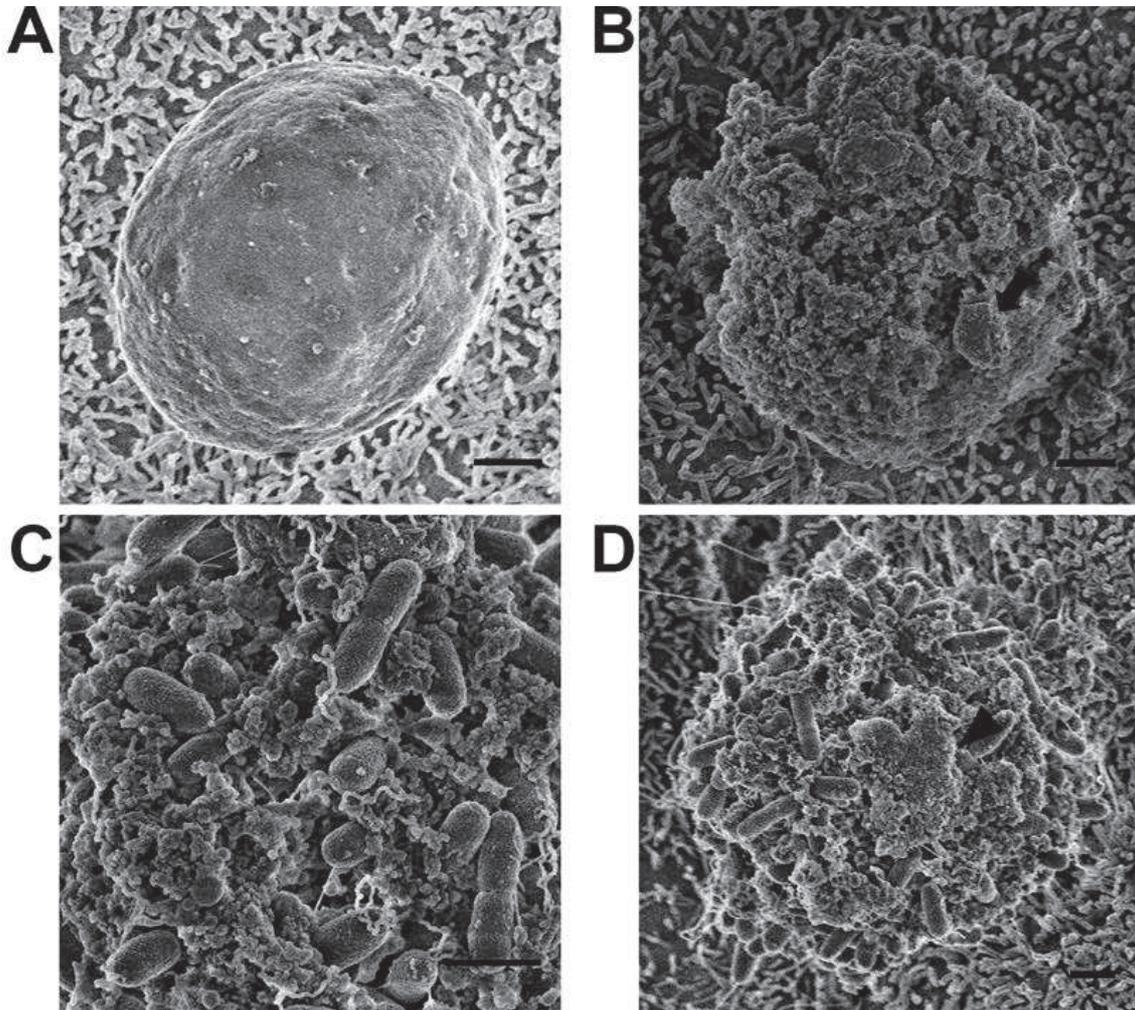
PAK-GFP / CellMask

**Figura 3.14.** La marcación con CellMask presenta el mismo patrón heterogéneo que el visto anteriormente para AnexinaV. Célula apoptótica teñida con CellMask en la que pueden verse PAK-GFP adherida a las zonas de marcación más intensa. La célula apoptótica marcada con CellMask se ve en azul, PAK-GFP se ve en verde. Barra de escala 5  $\mu$ m.

un gran número de bacterias adheridas, muchas de las cuales parecen introducirse en invaginaciones de la membrana plasmática. Al tener la membrana segmentada en un alto número de vesículas, estas zonas presentan una gran superficie expuesta. En la Figura 3.15D puede observarse una región en donde la membrana no está segmentada y las bacterias no se adhieren (triángulo negro). Estas imágenes muestran que *P. aeruginosa* tiene preferencia por células apoptóticas cuya superficie está vesiculizada. Además, en células con heterogeneidad en la morfología de su membrana, las bacterias se unen a aquellas zonas que se encuentren cubiertas de vesículas o cuerpos apoptóticos. Que haya células con zonas lisas y zonas cubiertas de cuerpos apoptóticos de distintos tamaños, puede explicar los patrones observados en la marcación tanto con AnexinaV como con CellMask.

Como se mencionó anteriormente, en la Figura 3.15C se observa como *P. aeruginosa* se introduce en las invaginaciones de la membrana de la célula apoptótica, lo cual también se muestra en la Figura 3.16, donde células MDCK

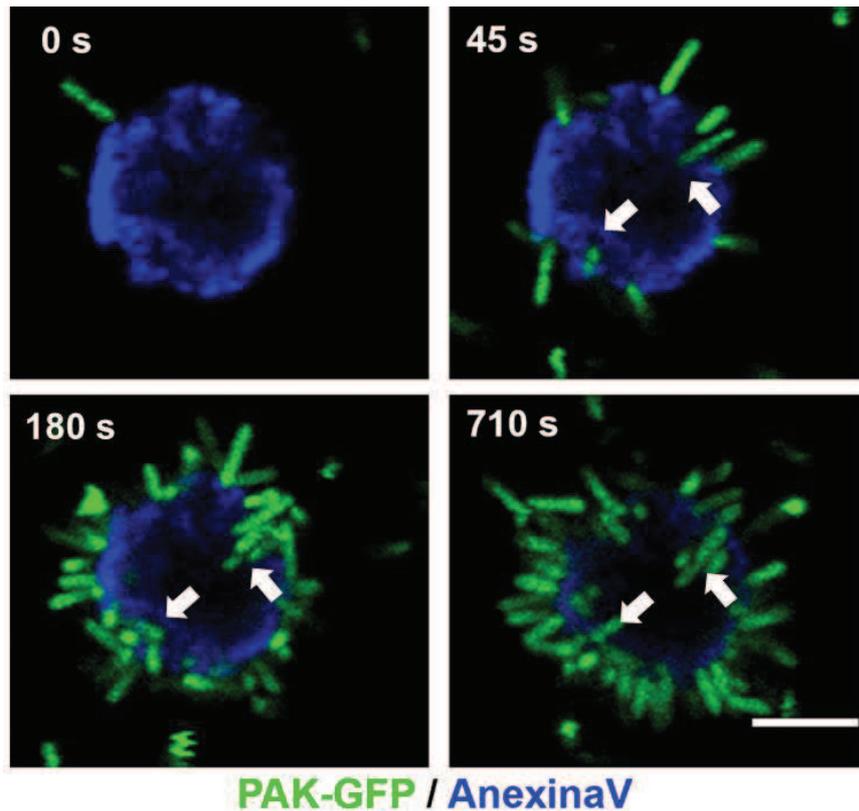
crecidas en placas con fondo de vidrio fueron infectadas con PAK-GFP. Las flechas blancas señalan este fenómeno.



**Figura 3.15. Microscopia electrónica de barrido de células apoptóticas.** A-B) células apoptóticas extruidas provenientes de una monocapa celular sin infectar. En A puede observarse que la superficie de la célula es mayormente lisa. En B) se ven cuerpos apoptóticos pequeños y grandes, la flecha negra señala un cuerpo apoptótico de gran tamaño. C-D) Célula apoptótica con bacterias adheridas, en D puede apreciarse una zona no vesiculizada (triángulo negro) a la cual no se adhieren las bacterias. Barra de escala 1  $\mu$ m.

El video representado en la Figura 3.16 puede verse en el siguiente link:

<https://youtu.be/1meILxYIXK8>



**Figura 3.16. *P. aeruginosa* puede introducirse en invaginaciones de la membrana plasmática.** Videomicroscopía en la que se muestra a la bacteria introduciéndose en invaginaciones de la membrana plasmática a lo largo del tiempo. La célula apoptótica marcada con AnexinaV-Alexa647 se ve en azul, PAK-GFP se ve en verde. Barra de escala 5  $\mu$ m.

Estos resultados muestran que *P. aeruginosa* no se une a todas las células apoptóticas por igual y en una misma célula, existen zonas de preferencia para la bacteria. Estas zonas están caracterizadas por gran número de cuerpos apoptóticos lo que confiere una alta rugosidad. Así, la morfología que adquiere la membrana sería un factor clave para la adhesión de *P. aeruginosa*, lo que explica, al menos en parte, por qué la bacteria prefiere las células apoptóticas tardías.

### **3.6. Bacterias agrupadas, presentes en el medio, pueden incorporarse a los agregados formados sobre células apoptóticas**

En varios videos observamos un fenómeno muy interesante: vimos que la estructura final del agregado, no sólo se ve determinada por la adhesión de bacterias planctónicas, sino que puede existir contribución de pequeños

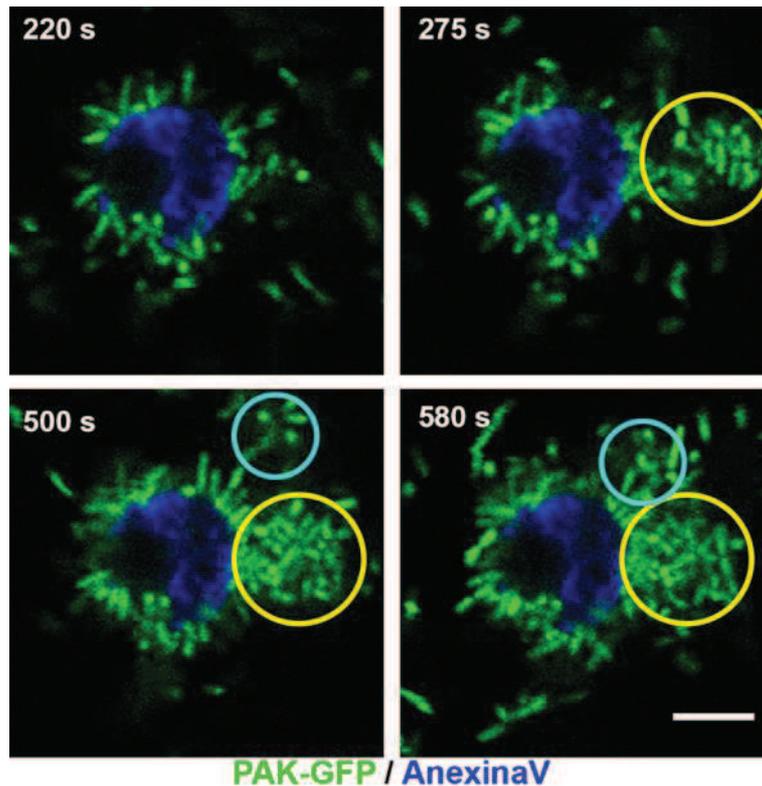
agregados o “clumps”, que se forman independientemente de la célula apoptótica y que parecen difundir por el medio de cultivo. Los clumps pueden incorporarse a los agregados formados, alterando su estructura tridimensional, generando zonas de múltiples capas de bacterias. Donde ocurrió el pegado del clump, las bacterias permanecen adheridas de manera desordenada, a diferencia de aquellas zonas donde se unieron bacterias planctónicas por un extremo. En la Figura 3.17 puede verse una célula apoptótica, con bacterias adheridas, a la que se le unen 2 clumps (marcados con círculos).

Si bien ignoramos cómo se forman estos clumps, especulamos que podría haber algún sustrato presente en el medio, que reclute a bacterias planctónicas. En el siguiente video (<https://youtu.be/QNwUMDFBTGk>) puede verse un clump formándose al lado de un agregado y luego incorporándose al mismo.

El video correspondiente a la Figura 3.17 puede verse en el siguiente link: <https://youtu.be/2l6XzOqc828>

Esto muestra que la morfología final del agregado está determinada, no solo por la interacción de bacterias planctónicas que se unen directamente a la célula apoptótica, sino también, por pequeñas estructuras previamente formadas que se incorporan al agregado. Estamos actualmente abordando el estudio de este fenómeno para poder comprenderlo en mayor profundidad.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que la formación de agregados de *P. aeruginosa* ocurre principalmente sobre células apoptóticas tardías. Observamos que las células a las cuales se adhiere *P. aeruginosa* poseen bajo contenido intracelular de ERO. Además, estas células no presentan ADN intracelular, lo cual confirma su estatus de células apoptóticas tardías. La ausencia de ADN intracelular sugiere que la membrana plasmática se encuentra comprometida, ya que su disminución se da luego de que la célula se haya permeabilizado. En este contexto, *P. aeruginosa* podría estar interactuando con moléculas intracelulares, las cuales sólo resultarían accesibles en células cuya membrana celular esté dañada.



**Figura 3.17. Adhesión de clumps a una célula apoptótica con bacterias adheridas.** Se observa un ejemplo de la contribución de clumps de bacterias a la formación de un agregado. Se ve como, a lo largo del tiempo, estas estructuras bacterianas se acercan a la célula y luego se fusionan con el agregado ya formado. PAK-GFP se ve en verde, la célula apoptótica marcada con AnexinaV-Alexa647 se ve en azul. Barra de escala 5  $\mu$ m.

Por otro lado, en esta tesis se desarrolló un protocolo que permite la generación de videomicroscopías que registran las etapas iniciales de la formación de agregados de *P. aeruginosa* sobre células apoptóticas mediante el seguimiento de bacterias individuales. Hemos visto que las bacterias son capaces de cubrir la superficie de la célula en pocos minutos, uniéndose principalmente por un extremo. También vimos que las células apoptóticas representan un sustrato heterogéneo, lo que afecta la dinámica y distribución de las bacterias en el agregado, ya que *P. aeruginosa* parece unirse a zonas de las células apoptóticas que presentan alto grado de vesiculización. Finalmente, hemos registrado, que la arquitectura del agregado no solo es determinada por la unión de bacterias planctónicas, sino también, de bacterias que forman estructuras compactas multicelulares que se encuentran en el medio y que pueden fusionarse con un agregado preexistente.

Es importante destacar que el registro de la formación de estructuras multicelulares en tiempo real, con alta resolución temporal y con un seguimiento individual de las bacterias posibilita acceder a información relevante que sería inaccesible en estudios elaborados con datos poblacionales y/o con muestras fijadas.

Nuestros estudios contribuyen a caracterizar en detalle la transición de *P. aeruginosa* desde un estado planctónico a uno multicelular en el contexto de la interacción con la barrera epitelial. Este tipo de transición ha sido poco estudiada y resulta clave para comprender las primeras etapas en la formación de biofilms en procesos infectivos.

#### **4. *P. aeruginosa* es internalizada en células epiteliales a través del mecanismo de eferocitosis**

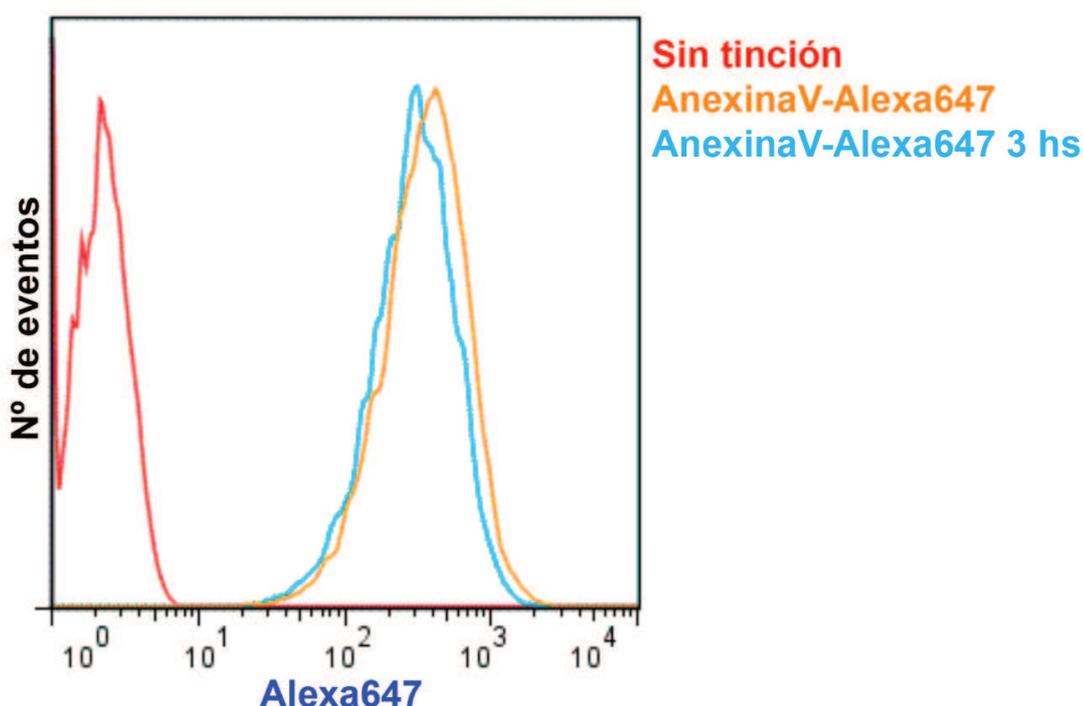
Como parte del proceso de renovación del tejido epitelial, las células que mueren por apoptosis son removidas por el mecanismo de extrusión, en el que las células vecinas, en forma coordinada, ejercen presión, estrangulando a la célula senescente y desplazándola hacia el lumen. Como consecuencia, las células vecinas quedan dispuestas formando una multiunión debajo de la célula apoptótica. Estas células viables que forman la multiunión pueden internalizar y degradar a la célula extruida mediante un proceso denominado eferocitosis. La eferocitosis se inicia cuando ligandos expuestos en la membrana plasmática de las células muertas (como se mencionó en la introducción, el más caracterizado es la fosfatidilserina [38]) se unen a receptores específicos en la célula viva. Esta unión induce rearrreglos del citoesqueleto, lo que genera la formación de prolongaciones de membrana de la célula viva que se extienden sobre la célula muerta. [37].

En estudios anteriores del grupo se demostró que *P. aeruginosa* se adhiere y agrega sobre células apoptóticas [66]. En nuestras imágenes de microscopía, repetidamente hemos encontrado prolongaciones de membrana provenientes de las células vecinas rodeando a células apoptóticas cargadas de bacterias. También hemos observado bacterias internalizadas en las células que forman parte de la multiunión. Debido a estas observaciones, nos planteamos como hipótesis que la internalización de *P. aeruginosa* adherida a células apoptóticas está asociada a la eferocitosis de las mismas.

##### **4.1. Ocorre eferocitosis en el sistema de células en cultivo utilizado**

Para poner a prueba la hipótesis de que la internalización de *P. aeruginosa* está mediada por eferocitosis, decidimos primero determinar si ocurre este proceso en nuestro sistema. El experimento que diseñamos para probarlo implica la tinción de las células apoptóticas de la monocapa con AnexinaV fluorescente y su posterior incubación por 3 hs. Pasado ese tiempo, se evalúa la presencia de marca intracelular de AnexinaV. Controlamos entonces, en primer lugar, que

dicha tinción se mantuviera estable durante ese tiempo. Para esto, se generaron células apoptóticas tardías mediante la irradiación de monocapas de células MDCK con luz UV de onda corta ( $6\text{mJ}/\text{cm}^2$  durante 1 minuto). Después del pulso, las células se incubaron en medio de cultivo sin suero durante 12 hs a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\%$   $\text{CO}_2$ . Pasado ese tiempo, se recuperaron las células apoptóticas del sobrenadante mediante centrifugación y luego se tiñeron con AnexinaV-Alexa647. Una parte de las células se fijó inmediatamente después de realizar la marcación y la otra parte se resuspendió en medio de cultivo sin suero y se incubó 3 hs a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\%$   $\text{CO}_2$ . La muestra se fijó y se evaluó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo (Figura 4.1).



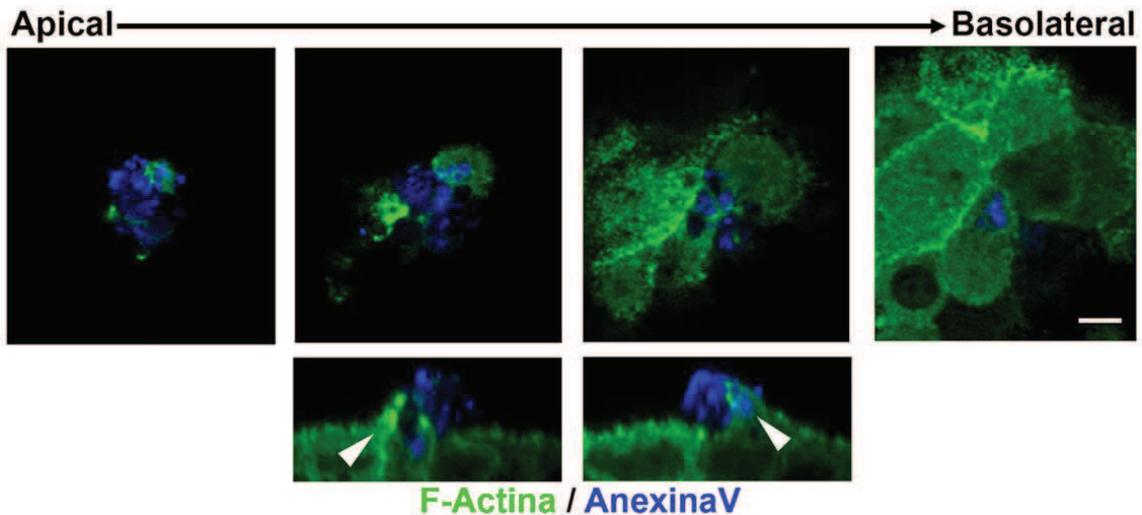
**Figura 4.1. La marcación con AnexinaV se mantiene luego de 3 hs de incubación en medio de cultivo.** Células apoptóticas sin teñir (rojo), teñidas con AnexinaV-Alexa647 (naranja) o teñidas con AnexinaV-Alexa647 e incubadas en medio de cultivo durante 3 hs a  $37^\circ\text{C}$  y  $5\%$   $\text{CO}_2$  (celeste). El eje X representa la intensidad de fluorescencia de la marca de AnexinaV-Alexa647.

En la Figura 4.1 se observa que, luego de incubar las células apoptóticas durante 3 hs en medio de cultivo, la marca de AnexinaV-Alexa647 permanece estable. Teniendo en cuenta este resultado, se procedió a hacer el experimento para evaluar eferocitosis. Para esto, se utilizaron células MDCK Lifeact-GFP, las cuales expresan un péptido fusionado a GFP que es capaz de unirse a filamentos

de actina, lo que permite, dada la localización cortical de la actina polimerizada, visualizar el contorno de la célula. Monocapas de estas células se tiñeron con AnexinaV-Alexa647 y se incubaron por 3 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para permitir la internalización del material apoptótico. Pasado ese tiempo, las células se fijaron y la presencia de material apoptótico intracelular se evaluó mediante microscopía confocal. En la Figura 4.2 se observa marca de AnexinaV dentro de las células de la multiunión y prolongaciones de membrana provenientes de estas células, sobre la célula apoptótica. Es interesante notar que las células vecinas no eferocitan la célula apoptótica entera, sino que internalizan fragmentos (cuerpos apoptóticos). Está descrito en la literatura que los fagocitos no profesionales como células epiteliales y fibroblastos tienen menor capacidad de internalizar y digerir restos celulares que los fagocitos profesionales [71]. También puede verse que la multiunión se mantiene organizada a pesar de que dos de las células que la forman poseen prolongaciones de membrana proyectadas sobre la célula apoptótica.

En otro grupo de experimentos se evaluó la eferocitosis de células apoptóticas provenientes del sobrenadante de un cultivo sobrecrecido y de células apoptóticas generadas por irradiación con luz UV. Previamente, en nuestro laboratorio se verificó que efectivamente estas células eran apoptóticas [69]. Se tiñeron con AnexinaV-Alexa647 y se agregaron a la monocapa de MDCK Lifeact-GFP (5 células apoptóticas/100 células vivas). Se observaron prolongaciones de membrana y material apoptótico internalizado en ambos casos. Estos experimentos muestran que las células epiteliales de nuestro sistema son también capaces de eferocitar células apoptóticas que no fueron extruidas de la misma monocapa.

Para entender la magnitud del proceso eferocítico en nuestro sistema, se calculó el porcentaje de células que internalizan material apoptótico. Se determinó que un  $1,14 \pm 0,05$  % de las células de la monocapa poseen material apoptótico internalizado. También se cuantificó el número de células apoptóticas extruidas de la monocapa y se calculó el porcentaje de casos que estaban asociados a eventos de eferocitosis. Se verificó internalización de material apoptótico en el  $35,27 \pm 2,00$  % de los casos en los que había una célula apoptótica y se vio que,

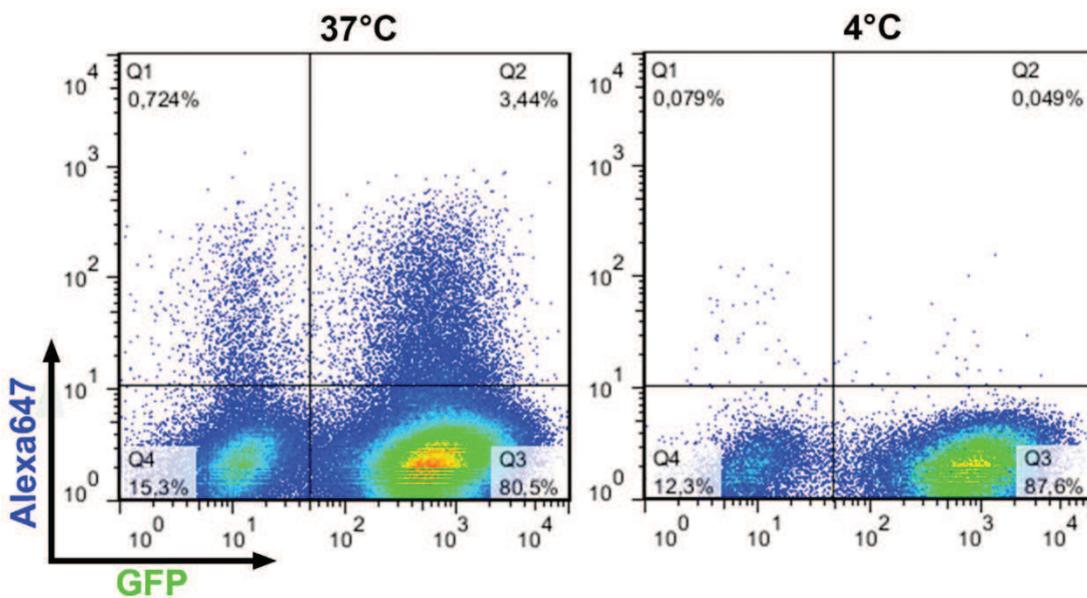


**Figura 4.2. Eferocitosis de una célula apoptótica por células MDCK Lifeact-GFP.** Monocapa de células MDCK Lifeact-GFP (verde) teñida con AnexinaV-Alexa647 (azul) e incubada por 3 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Paneles superiores: Planos XY a lo largo del eje Z del mismo evento de eferocitosis yendo de sentido apical a basal. Paneles inferiores: planos XZ (reconstrucción ortogonal). Los triángulos blancos indican prolongaciones de membrana. Barra de escala 5 µm.

cuando hay eferocitosis, el  $40,89 \pm 3,44$  % de las células que forman parte de la multiunión, tienen material apoptótico internalizado. Siendo que el  $74,51 \pm 0,57$ % de las multiuniones bajo las células apoptóticas corresponden a multiuniones de entre 4 y 5 células, suelen ser 2 las células que eferocitan. Se calculó también, el porcentaje de células apoptóticas con prolongaciones de membrana asociadas y se vio que  $47,89 \pm 4,73$  % de las células apoptóticas tienen prolongaciones de membrana unidas provenientes de las células viables de la multiunión.

Se decidió evaluar la eferocitosis en nuestro sistema por otra técnica, por lo que se midió el porcentaje de células con material apoptótico internalizado mediante citometría de flujo. Para este experimento, se utilizaron células MDCK Lifeact-GFP crecidas sobre filtros transwell y células apoptóticas MDCK wt generadas por luz UV, teñidas con AnexinaV-Alexa647. Estas últimas se agregaron a la monocapa (10 células apoptóticas cada 100 células viables) y se incubaron por 3 hs. Las células se lavaron, se levantaron con tripsina, se resuspendieron en MEM con suero fetal bovino, se centrifugaron y el pellet se resuspendió en PFA 2% en Binding Buffer. Luego se centrifugaron nuevamente, se resuspendieron en Binding Buffer y se pasaron por el citómetro, donde se midió el porcentaje de

eventos con doble marca (Q2, panel derecho superior): células viables (GFP) con material apoptótico internalizado (Alexa647). Se analizaron 2 condiciones: células incubadas a 37°C y células incubadas a 4°C. La incubación a 4°C se hace para controlar que lo que se está midiendo es material apoptótico internalizado y no material adherido a la superficie de la célula. La adhesión de los cuerpos apoptóticos a sus receptores en las células de la monocapa puede ocurrir a 4°C, sin embargo, la internalización requiere una temperatura de 37°C. Así, la presencia de eventos en Q2 de la Figura 4.3, confirma que hay feroctosis. Además, el porcentaje de células con material apoptótico internalizado está en el mismo orden que el calculado por microscopía. Dado que con este enfoque se estudia una población de células mucho mayor que la que analizamos por microscopía confocal, la similitud de valores valida nuestros resultados previos.



**Figura 4.3. Feroctosis por células MDCK Lifeact-GFP medida por citometría.** DotPlot representando la internalización de material apoptótico a 37°C (izquierda) y a 4°C (derecha). El eje X representa la intensidad de fluorescencia de la marca de GFP y en el eje Y se ve la intensidad de fluorescencia de la marca de AnexinaV-Alexa647.

Podemos concluir que, en monocapas polarizadas de células MDCK, ocurre feroctosis tanto de células apoptóticas extruidas como de células apoptóticas agregadas a la monocapa.

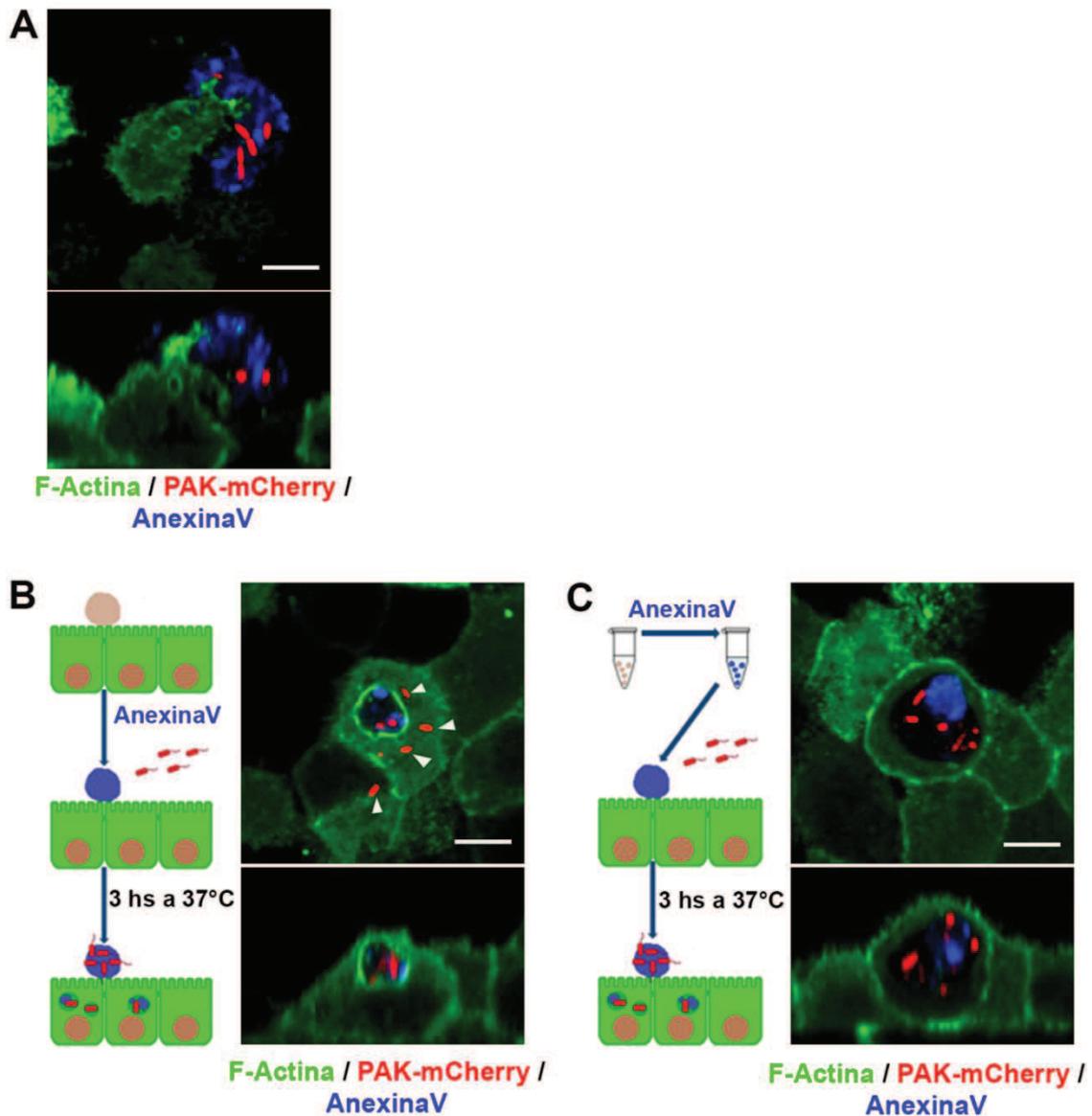
#### **4.2. La internalización de *P. aeruginosa* en células epiteliales está asociada a la internalización de células apoptóticas.**

Para poner a prueba la hipótesis de que la internalización de *P. aeruginosa* está asociada a la eferocitosis de las células apoptóticas a las que se adhiere, se evaluó la presencia conjunta, dentro de la célula, de material apoptótico y bacterias. Se infectaron monocapas de células MDCK Lifeact-GFP con PAK-mCherry (MOI 60). Se presentan esquemas de los dos protocolos seguidos en las Figuras 4.4B y 4.4C. En el primer caso (donde la fuente de células apoptóticas fueron aquellas extruidas de la monocapa) la infección se realizó luego de marcar las células con AnexinaV-Alexa647. En el segundo caso las bacterias se agregaron junto con células apoptóticas generadas por luz UV, teñidas con AnexinaV-Alexa647. En ambos casos, se vieron prolongaciones de membrana de las células viables extendidas hacia células apoptóticas con bacterias adheridas (Figura 4.4A). se calculó que, en cultivos infectados, el  $46,59 \pm 4,87$  % de las células apoptóticas tienen prolongaciones de membrana unidas. Independientemente del protocolo seguido, se observaron vesículas intracelulares conteniendo tanto *P. aeruginosa* como restos celulares (Figura 4.4B y 4.4C). En ocasiones, encontramos que las bacterias y el material apoptótico no se encontraban en el mismo compartimiento (Figura 4.4B, triángulos blancos) y otras veces observamos que ambos se encontraban dentro de la misma vesícula (Figura 4.4C). En la Figura 4.3B se observa, además, que la vesícula está rodeada de filamentos de actina. Está descrito que, durante los momentos iniciales de la eferocitosis, las vesículas conteniendo material apoptótico se rodean de fibras de actina [72]. Si bien hemos visto este fenómeno en varias ocasiones, no nos hemos adentrado en su estudio.

Se midió el porcentaje de bacterias internalizadas dentro de células que también contuvieran material apoptótico, pudiendo estar en el mismo o en diferentes compartimientos. Se encontró que el  $59,65 \pm 7,00$  % de las bacterias internalizadas estaba dentro de células que además contenían restos celulares eferocitados.

Una observación que hemos hecho consistentemente en nuestros estudios es que, en la mayoría de los casos donde hay internalización de material apoptótico

(tanto en ausencia como en presencia de bacterias), la célula apoptótica extruida (de la cual proviene ese material) está en un estadio tardío de apoptosis (estadio 4). Esta observación es coincidente con reportes que muestran que las células epiteliales internalizan células apoptóticas que están en estadios más tardíos que los descritos para fagocitos profesionales, como los macrófagos [44]. Esto podría deberse a que la célula debe estar escindida en cuerpos apoptóticos para poder ser internalizada por otras células epiteliales, por lo que solo las células en estadios avanzados de apoptosis serían internalizadas. En el capítulo anterior vimos que *P. aeruginosa* se adhiere a regiones de la célula muerta que ya están escindidas en vesículas o cuerpos apoptóticos. La adhesión a estas superficies facilitaría así la internalización de la bacteria asociada a eferocitosis.

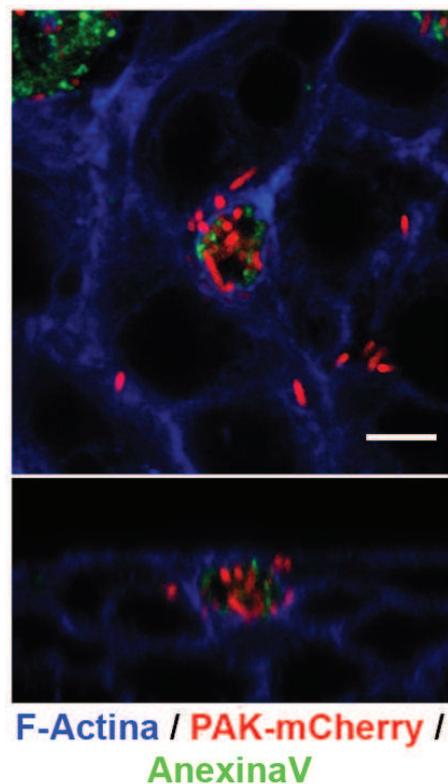


**Figura 4.4. *P. aeruginosa* puede ser encontrada dentro de células que tienen material apoptótico eferocitado.** Células MDCK Lifeact-GFP (verde) teñidas con AnexinaV-Alexa647 (azul) e infectadas con PAK-mCherry (rojo). A). Se observa una prolongación de membrana que se extiende hacia una célula apoptótica con bacterias adheridas. B-C). Los esquemas a la izquierda muestran el protocolo seguido. En ambos casos se observaron vesículas conteniendo material apoptótico y bacterias. Planos XY (arriba) y reconstrucción ortogonal XZ (abajo). Barra de escala 5  $\mu$ m.

#### 4.3. La asociación entre bacterias y material apoptótico internalizado también se observa en células epiteliales de pulmón

Para evaluar si el fenómeno descrito en la sección anterior es independiente de la línea celular, se utilizaron células 16HBE14o-, que son derivadas de epitelio

bronquial normal humano. Se decidió trabajar con estas células debido a la importancia de *P. aeruginosa* en infecciones pulmonares [73]. Para este experimento, células 16HBE14o- crecidas en filtros transwell fueron marcadas con AnexinaV-Alexa488 e incubadas con PAK-mCherry durante 3 hs a 37°C y % 5 CO<sub>2</sub>. También en este caso se encontraron células que contenían material apoptótico junto con bacterias (Figura 4.5), lo que indica que el fenómeno descrito es independiente de la línea celular.

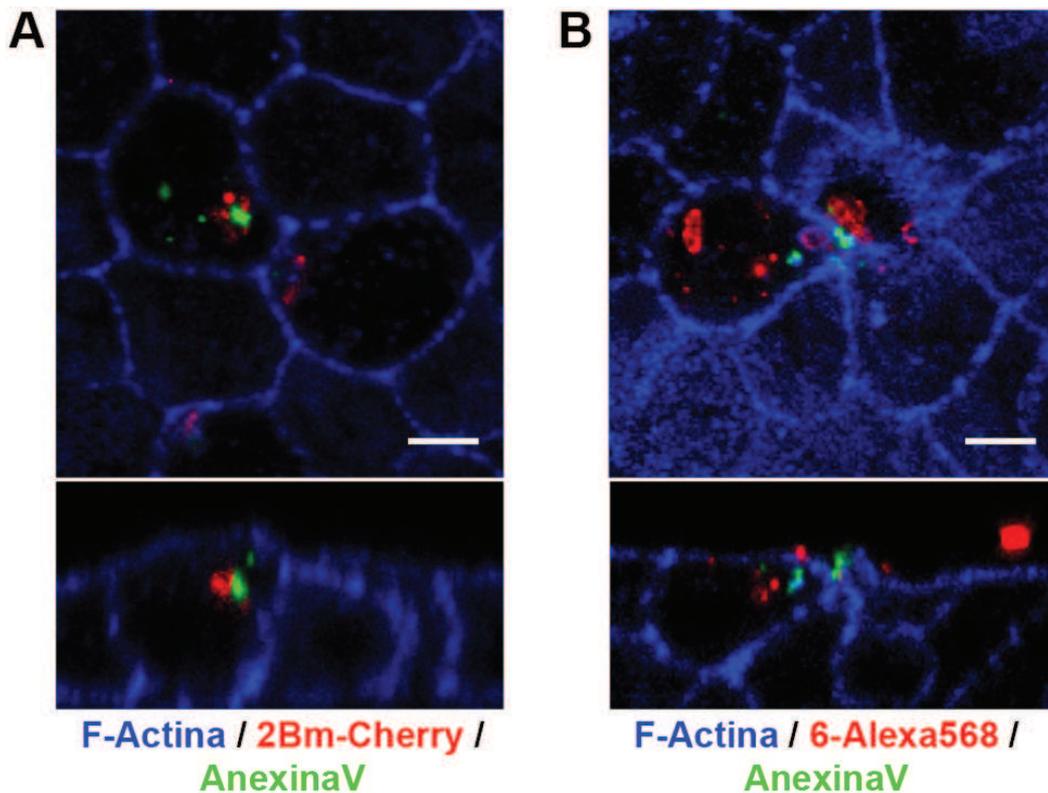


**Figura 4.5.** *P. aeruginosa* también puede ser encontrada dentro de células epiteliales de pulmón que tienen material apoptótico eferocitado. Células 16HBE14o- (azul) teñidas con AnexinaV-Alexa488 (verde) e infectadas con PAK-mCherry (rojo). Planos XY (arriba) y reconstrucción ortogonal XZ (abajo). Barra de escala 5  $\mu$ m.

#### **4.4. Aislamientos de *P. aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística también pueden ser encontrados junto a material apoptótico eferocitado**

Como se mencionó en la introducción, *P. aeruginosa* establece infecciones crónicas en pacientes con fibrosis quística que afectan severamente su calidad

y expectativa de vida y son uno de los factores principales que contribuyen a la mortalidad. Una variante fenotípica que se selecciona con alta frecuencia en el pulmón fibroquístico es el fenotipo mucoso, sin embargo, tanto cepas mucosas como no mucosas pueden coexistir. Decidimos entonces repetir los experimentos descritos con aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística. Infectamos células MDCK con las cepas fibroquísticas 2B, una cepa mucosa, y 6, una cepa no mucosa [74]. La cepa 2B fue previamente transformada con el plásmido que porta mCherry, mientras que la cepa 6 se visualizó por marcación con un anticuerpo anti-*P. aeruginosa* (y anticuerpo secundario conjugado a Alexa568). En ambos casos se vieron bacterias internalizadas junto a material apoptótico (Figura 4.6A y B). Se determinó que el  $64,54 \pm 0,98$  % de *P. aeruginosa* cepa 2B y el  $47,85 \pm 4,34$  % de *P. aeruginosa* cepa 6 se encontraban dentro de células con material apoptótico intracelular. Estos resultados muestran que independientemente de la cepa de *P. aeruginosa* utilizada, es posible encontrar a la bacteria internalizada junto con material apoptótico. Los porcentajes se calcularon a partir de tres experimentos independientes y están representados como la media  $\pm$  el error estándar (SEM).

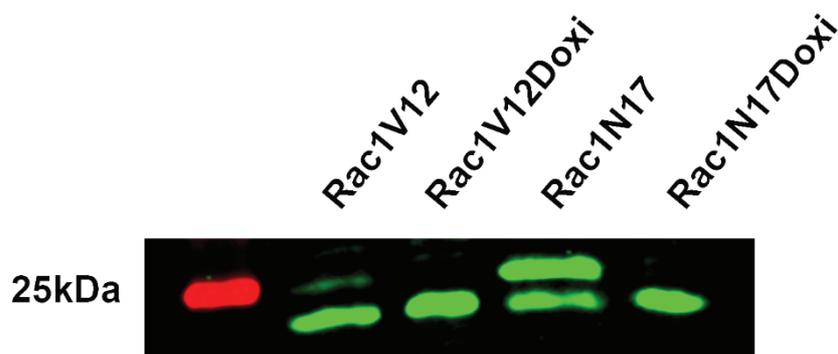


**Figura 4.6. *P. aeruginosa* internalizada puede ser localiza junto con material apoptótico.** Células MDCK (azul) teñidas con AnexinaV-Alexa488 (verde) e infectadas con *P. aeruginosa* cepa 2B-mCherry (A) o *P. aeruginosa* cepa 6 (B). Las bacterias se ven en rojo. Planos XY (arriba) y reconstrucción ortogonal XZ (abajo). Barra de escala 5  $\mu$ m

#### 4.5. Al modular la eferocitosis se afecta en el mismo sentido la internalización de *P. aeruginosa*

Los resultados hasta aquí presentados muestran que *P. aeruginosa* puede ser internalizada por las células epiteliales junto con material apoptótico y que este fenómeno no depende de la línea celular ni de la cepa bacteriana. Nos preguntamos ahora, si la eferocitosis es necesaria para la internalización de la bacteria. Para responder esta pregunta, manipulamos la actividad de la pequeña GTPasa Rac1, cuyo rol en la eferocitosis ha sido ampliamente documentado [39]. La interacción de la fosfatidilserina expuesta en la membrana de las células apoptóticas con sus respectivos receptores, presentes en la superficie de las células viables, activa distintas vías de señalización que convergen en la activación de Rac1, que es capaz de regular positivamente la internalización de la célula apoptótica a través de la polimerización de filamentos de actina, lo que

da lugar a la formación de prolongaciones de membrana sobre la célula muerta. Utilizamos las líneas celulares MDCK Rac1N17 y MDCK Rac1V12, las cuales expresan condicionalmente una versión dominante negativo y una constitutivamente activa de la proteína Rac1, respectivamente. Ambas líneas expresan Rac1 exógena en ausencia de doxiciclina, pero no en presencia de 20 ng/ml de la droga. Luego de sembrar las células en filtros transwell, éstas se incuban 48 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en presencia o ausencia de doxiciclina. Para corroborar la correcta expresión de las proteínas, se hizo un western blot con lisados celulares. Las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti-Rac1. La proteína Rac1 endógena tiene una movilidad diferente a la exógena debido a que ésta última porta el péptido-sígnal Myc en su región N-terminal. Así, con el mismo anticuerpo pueden distinguirse ambas proteínas (Figura 4.7). Puede verificarse la expresión de Rac1N17 y Rac1V12 en ausencia de doxiciclina. Para probar la influencia de Rac1 en la internalización de bacterias, se generaron células apoptóticas mediante irradiación con luz UV, se tiñeron con AnexinaV-Alexa647 y se agregaron a monocapas de células MDCK expresando las distintas versiones de Rac1 exógena (5 células apoptóticas cada 100 células viables) junto con PAK-GFP (MOI 60) y luego se incubaron por 3 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

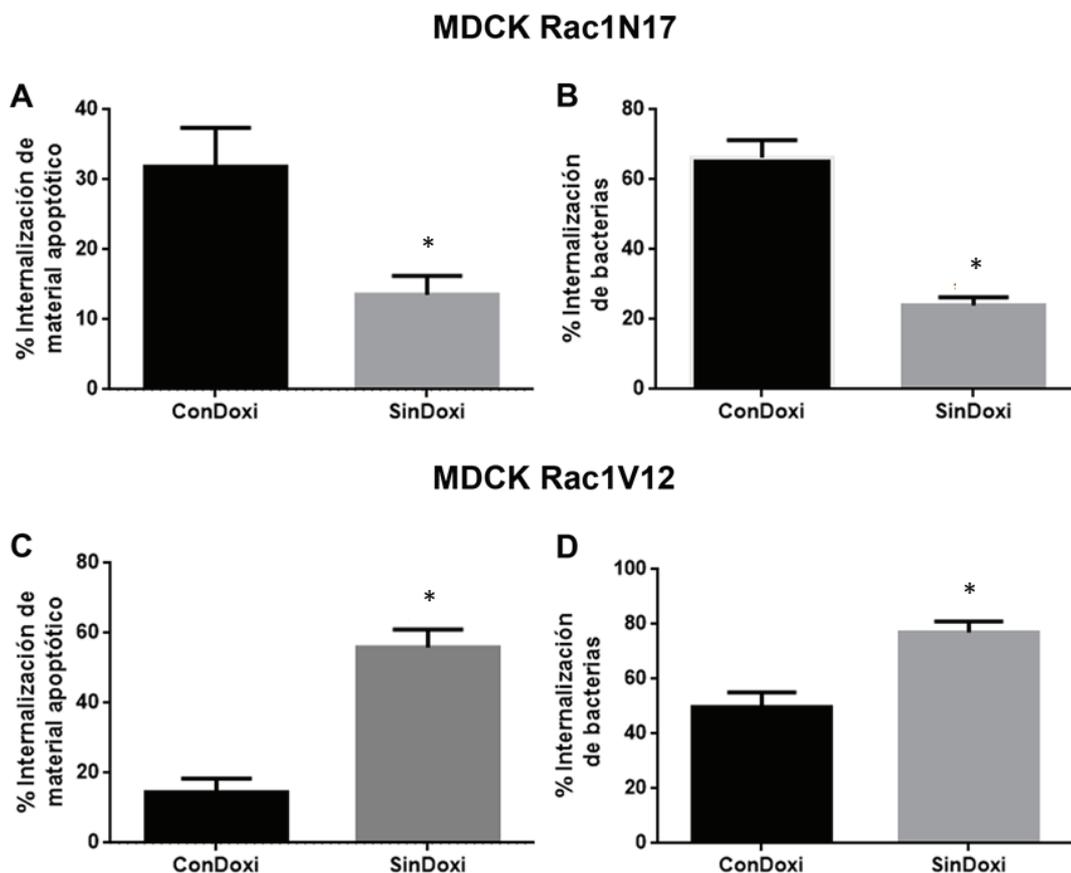


**Figura 4.7. Expresión de Rac1 exógena.** Western blot en el que se muestra la expresión de Rac1 exógena en ausencia de doxiciclina para ambas líneas celulares. La banda superior corresponde a la proteína exógena, que al estar fusionada al péptido-sígnal Myc, tiene menor movilidad. La banda inferior corresponde a la proteína endógena.

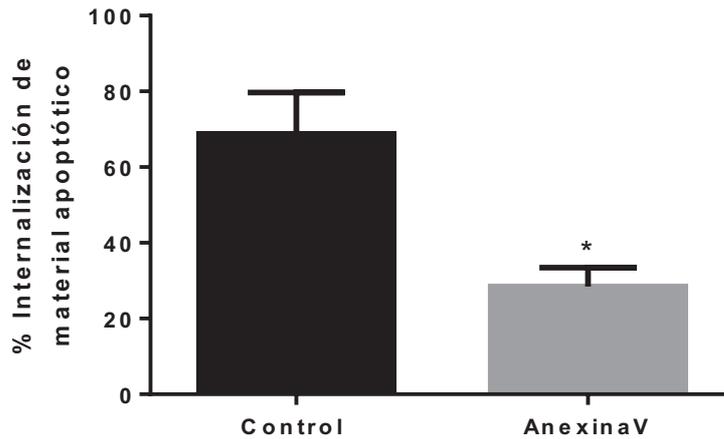
Utilizando la herramienta 3D-Object Counter del ImageJ se cuantificó el volumen de material apoptótico y bacterias asociados a la monocapa en ausencia o presencia de 20ng/ml de doxiciclina y se calculó el porcentaje de internalización

en cada caso. En las células que expresaban Rac1 dominante negativo (Rac1N17) no solo se vio disminuida la internalización de material apoptótico (Figura 4.8A), como se esperaba, sino también la internalización de bacterias (Figura 4.8B). En células donde Rac1 estaba activada constitutivamente (Rac1V12) se observó el resultado opuesto: aumentó tanto la internalización de material apoptótico (Figura 4.8C) como de bacterias (Figura 4.8D).

Para reforzar los resultados anteriores, decidimos inhibir la eferocitosis de manera más específica: bloqueando la fosfatidilserina expuesta en la membrana de células apoptóticas con AnexinaV. Previamente en nuestro laboratorio, se vio que el tratamiento de la monocapa con AnexinaV disminuye la internalización de material apoptótico a un  $41,19 \pm 0,92\%$  del control (células tratadas con Binding Buffer) (Figura 4.9) [75].



**Figura 4.8. La actividad de Rac1 afecta la eferocitosis y la internalización de *P. aeruginosa*.** Porcentaje de material apoptótico y bacterias internalizadas por células MDCK expresando Rac1 dominante negativo (Rac1N17; A-B) o una versión de Rac1 constitutivamente activa (Rac1V12; C-D). Los gráficos representan la media  $\pm$  SEM. El efecto de los factores sobre la proporción de material apoptótico y bacterias internalizadas se evaluó mediante un análisis de modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) con estructura de error beta.



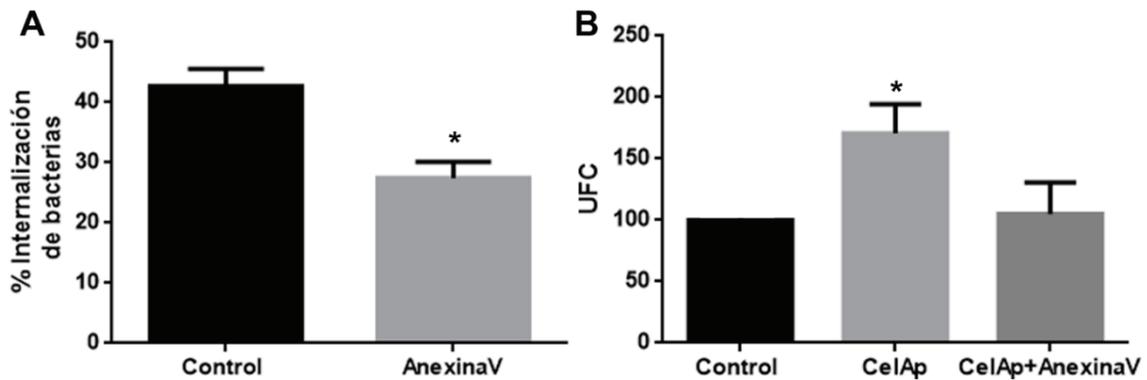
**Figura 4.9. El tratamiento con AnexinaV inhibe la eferocitosis.** Porcentaje de material apoptótico internalizado en células MDCK incubadas con Binding Buffer (Control) o AnexinaV. Los gráficos representan la media  $\pm$  SEM [75].

Es importante aclarar que, como comprobamos previamente en el laboratorio, la concentración de AnexinaV que se utiliza para bloquear es aproximadamente 70 veces mayor que la que se usa para marcar la célula apoptótica para ensayos de inmunofluorescencia [75].

Para este experimento se utilizaron células MDCK Lifeact-GFP, las cuales fueron incubadas 15 minutos con AnexinaV en Binding Buffer (15 $\mu$ g cada 100.000 células) a temperatura ambiente. Luego de la incubación, la AnexinaV se lavó y se agregó medio de cultivo sin suero. Como control, se utilizaron células incubadas únicamente en Binding Buffer. Luego se infectó con PAK-mCherry (MOI 60) durante 3 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente, las muestras se fijaron y se marcaron con anticuerpo anti-*P. aeruginosa*. La marcación con este anticuerpo en muestras sin permeabilizar permite automatizar el recuento de bacterias intra y extracelulares (ver Materiales y Métodos). Puede verse que la internalización de *P. aeruginosa* se ve disminuida cuando las células son previamente tratadas con AnexinaV (Figura 4.10A).

Utilizando una aproximación diferente, se estudió el efecto del tratamiento con AnexinaV mediante un ensayo de protección al antibiótico. Este ensayo consiste en tratar las células infectadas con antibióticos no permeables para eliminar las bacterias extracelulares. Una vez eliminadas, las células se lisan, se siembran diluciones del lisado en placas de LB-agar y se cuentan las unidades formadoras de colonias. De esta manera se obtiene información acerca del número de

bacterias intracelulares. Para llevar adelante este experimento, células apoptóticas provenientes de un cultivo sobrecrecido, que fueron previamente incubadas con AnexinaV o Binding Buffer, fueron agregadas a una monocapa de células MDCK crecidas sobre filtros transwell (6 células apoptóticas cada 100 células viables) junto con PAK (MOI 10). También se infectaron células a las que no se les agregaron células apoptóticas. Las muestras se incubaron durante 2 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y luego el medio se lavó y se agregó medio de cultivo con 300 µg/ml de gentamicina. Se incubó durante 1 h con el antibiótico a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y luego se lisó con Tritón-100X y se plaqueó. Como se observa en la Figura 4.10B, la adición de células apoptóticas aumentó significativamente la internalización de *P. aeruginosa*, es decir que al aumentar el material a eferocitar aumenta la internalización bacteriana. Ese incremento se vio inhibido cuando las células apoptóticas fueron tratadas previamente con AnexinaV. O sea, que al impedir que esas células apoptóticas sean eferocitadas, también se impide la internalización de la bacteria. Es importante recordar que las bacterias también están interactuando con las células apoptóticas extruidas de la monocapa, lo que explica, al menos en parte, la internalización basal. Cuando se analizó el número total de bacterias que interactúan con la monocapa (intra y extracelulares) en el ensayo de microscopía, no se vio una disminución de las bacterias totales en las células tratadas con AnexinaV, lo que sugiere que este tratamiento no disminuye la adhesión de las bacterias, por lo que el efecto observado en los ensayos de protección al antibiótico con células tratadas con AnexinaV no pueden explicarse por una menor adhesión de las bacterias a la célula apoptótica. Estos experimentos muestran además que *P. aeruginosa* no estaría interactuando con la fosfatidilserina expuesta en la membrana de las células apoptóticas.



**Figura 4.10. El tratamiento con AnexinaV inhibe la internalización de *P. aeruginosa*.** A) Al Incubar la monocapa celular con AnexinaV se inhibe la internalización de PAK-mCherry. B) El tratamiento con AnexinaV inhibe el aumento generado en la internalización de bacterias por la adición de células apoptóticas. A) fue evaluado mediante un análisis de modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) con estructura de error beta. B) fue evaluado por ANOVA,  $P < 0,05$ . Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM

En base a todos estos resultados podemos concluir que la internalización de *P. aeruginosa* en células epiteliales está mediada por el mecanismo de eferocitosis, ya que no sólo encontramos material apoptótico internalizado junto con las bacterias, sino también que, al modular la eferocitosis (aumentándola o inhibiéndola), la internalización de las bacterias se ve afectada en el mismo sentido.

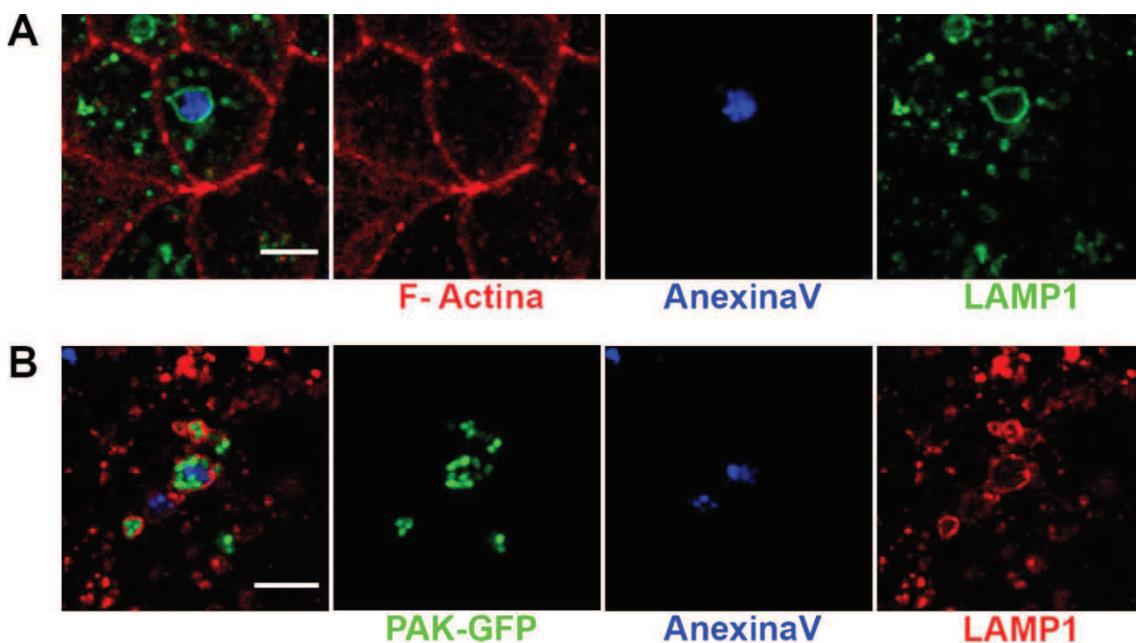
## **5. *Pseudomonas aeruginosa* es eliminada dentro de células epiteliales**

Luego de ser internalizadas, las células apoptóticas se localizan en vesículas intracelulares denominadas eferosomas, que se fusionan con lisosomas, lo que conduce a su procesamiento [34]. Como se demostró en el capítulo anterior, la internalización de *P. aeruginosa* está asociada a la eferocitosis de las células apoptóticas sobre las cuales se adhiere. Nos preguntamos entonces, si bacterias internalizadas mediante este mecanismo tendrán el mismo destino intracelular que los restos celulares eferocitados y si así fuera, qué pasa con la bacteria una vez que llega a lisosomas

### **5.1. Las bacterias y el material apoptótico intracelular se localizan en lisosomas**

Si bien sabemos que, como parte del proceso de eferocitosis, el material apoptótico internalizado se dirige a lisosomas, nos preguntamos si el destino es el mismo en células que fueron infectadas. Células MDCK crecidas en filtros transwell fueron marcadas con AnexinaV-Alexa647 e infectadas con PAK wt (Figura 5.1A) o PAK-GFP (Figura 5.1B) (MOI 60) por 3 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego, las células fueron fijadas, permeabilizadas y marcadas con un anticuerpo que reconoce a una proteína asociada a la membrana lisosomal (LAMP1, por sus siglas en inglés). En el caso en que se infectó con PAK wt, se estudió la frecuencia con la que el material apoptótico intracelular se encontraba en vesículas que tuvieran LAMP1 en su membrana (se cuantificó el número de partículas apoptóticas individuales internalizadas y se midió el porcentaje que estaba contenido dentro de vesículas LAMP1-positivas). Se vio que el  $62,34 \pm 0,98$  % del material apoptótico internalizado estaba dentro de estas vesículas, lo que sugiere que, en presencia de bacterias, el material apoptótico aún sigue la vía de degradación lisosomal. También se encontró material apoptótico junto con PAK-GFP dentro de vesículas LAMP1-positivas. Se observaron también vesículas que contenían, sólo bacterias o sólo partículas apoptóticas. Esto puede deberse a que el material apoptótico con el cual se internalizaron las bacterias

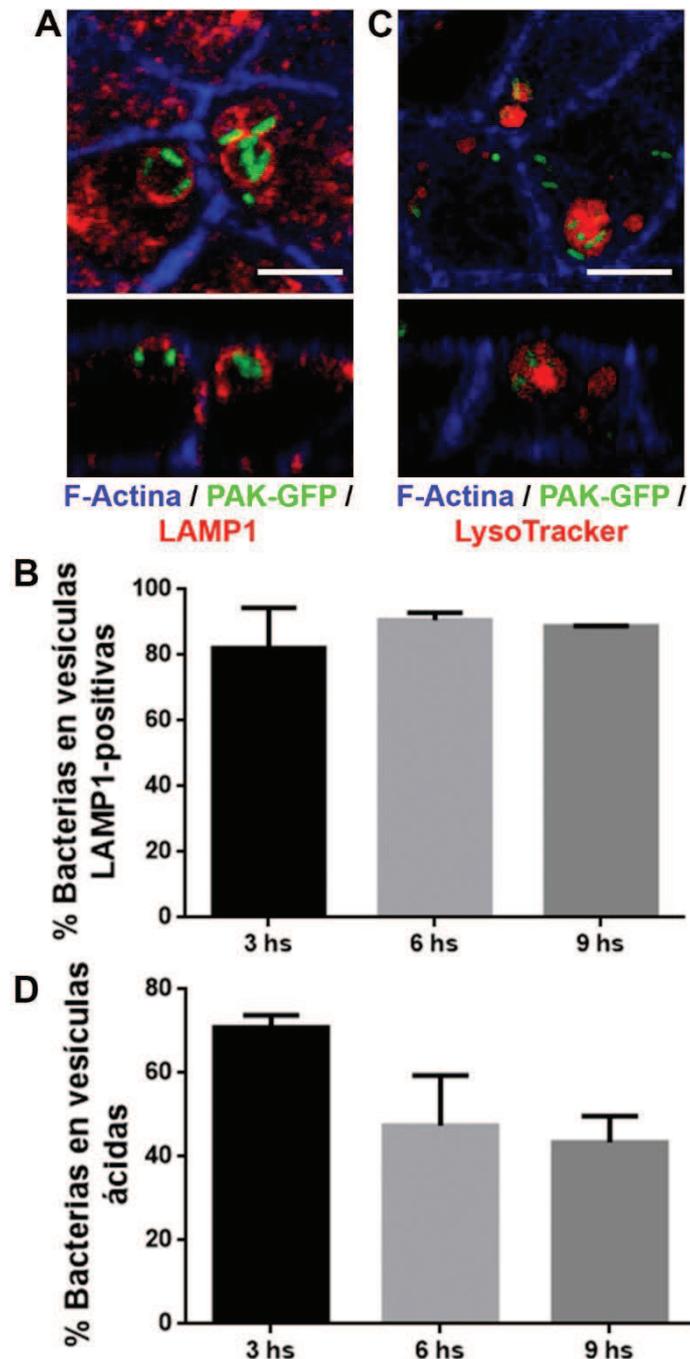
fue degradado, o que las bacterias y el material apoptótico siguen vías o tiempos diferentes de degradación una vez internalizadas.



**Figura 5.1. El material apoptótico intracelular y *P. aeruginosa* se encuentran en vesículas LAMP1-positivas.** Monocapa de células MCDK teñida con AnexinaV-Alexa647, infectada con PAK (A) o PAK-GFP (B) e incubadas por 3 hs. Las imágenes muestran planos XY. Barra de escala 5  $\mu$ m.

Para evaluar el porcentaje de bacterias, a lo largo del tiempo, que se encuentran en vesículas LAMP1-positivas, se infectaron monocapas de células MDCK con PAK-GFP (MOI 60) y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> por 3, 6 y 9 hs. Luego de 2 hs de infección, las células se lavaron y el medio se reemplazó por medio de cultivo con antibiótico (amikacina 400  $\mu$ g/ml) y se incubaron por 1 h más. Pasado ese tiempo, las células pertenecientes al tiempo 3 hs se fijaron, se permeabilizaron, se marcaron con anticuerpo anti-LAMP1, se tiñeron con faloidina-Alexa647 y se examinaron por microscopía confocal. A las células pertenecientes a los otros tiempos se les renovó el medio y se les aplicó una dosis de antibiótico más baja (amikacina 40  $\mu$ g/ml). Las células se incubaron 2 hs más. A las 5 hs post-infección se renovó nuevamente el medio con antibiótico. En el caso del tiempo 9 hs, el medio celular se volvió a renovar a las 8 hs post-infección. Puede verse, en todos los casos, que más del 80% de las bacterias internalizadas se encuentran en vesículas LAMP1-positivas (Figura 5.2A y 5.2B).

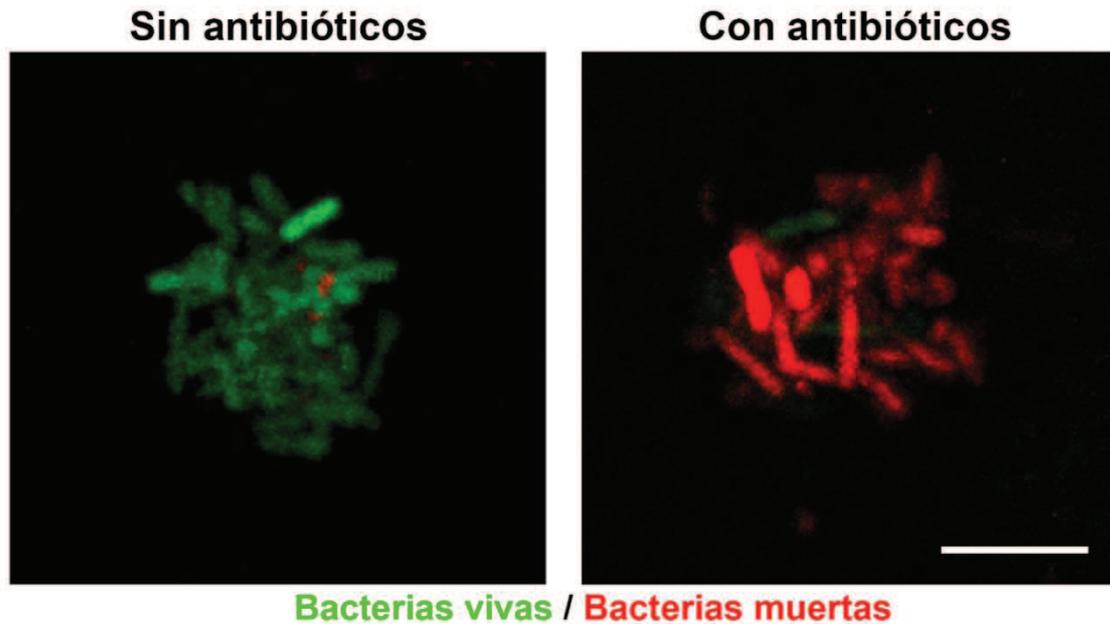
Ya que una característica de un lisosoma maduro y funcional es su acidificación, se decidió evaluar el pH de las vesículas que contienen *P. aeruginosa* intracelular. Para esto, se infectaron células MDCK con PAK-GFP (MOI 60) y se incubaron por distintos tiempos (3, 6 y 9 hs) y luego se tiñeron con LysoTracker, una sonda fluorescente que permea por las membranas celulares y es retenida en organelas que poseen pH ácido. Luego de la marcación con LysoTracker, las células se fijaron, se tiñeron con faloidina-Alexa647 y se analizaron por microscopía confocal (Figura 5.2C y 5.2D). Se encontró que entre el 45 y el 70% de las bacterias intracelulares se encontraban en vesículas ácidas, lo que sugiere que el destino de *P. aeruginosa* son lisosomas maduros. Observamos un menor porcentaje de bacterias presentes en vesículas positivas para LysoTracker en comparación al porcentaje de bacterias presentes en vesículas LAMP1-positivas. Por otro lado, también vimos una disminución del porcentaje de bacterias en organelas ácidas a tiempos más prolongados. El menor porcentaje de bacterias en vesículas ácidas en comparación con las presentes en vesículas LAMP1-positivas puede deberse a que, algunas de las vesículas conteniendo bacterias todavía no corresponden a lisosomas maduros. En cuanto a la disminución del porcentaje de bacterias en vesículas positivas para LysoTracker a lo largo del tiempo, esto podría explicarse por a la pérdida de la fluorescencia dentro de los lisosomas una vez que estos se vuelven maduros y funcionales, ya que GFP no es estable a pH ácidos.



**Figura 5.2. *P. aeruginosa* intracelular se encuentra en lisosomas maduros.** A) Proyección XY (arriba) y reconstrucción ortogonal XZ (abajo) de una imagen que muestra bacterias dentro de vesículas LAMP1-positivas. B) Porcentaje de bacterias intracelulares contenidas dentro de vesículas LAMP1-positivas C) Proyección XY (arriba) y reconstrucción ortogonal XZ (abajo) de una imagen que muestra vesículas ácidas con bacterias. D). Porcentaje de bacterias intracelulares contenidas dentro de vesículas ácidas. Barra de escala 5  $\mu$ m. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM

## **5.2. Los agregados de *P. aeruginosa* son susceptibles a los tratamientos con antibióticos aplicados en nuestros experimentos**

Debido a la capacidad bactericida de los lisosomas, nos propusimos estudiar la sobrevivencia intracelular de *P. aeruginosa* a lo largo del tiempo mediante un ensayo de protección al antibiótico. Para llevar adelante este objetivo, lo primero que hicimos fue asegurarnos de que las bacterias que contabilizamos en el ensayo de protección fueran realmente intracelulares ya que se ha reportado que *P. aeruginosa* presenta resistencia a antibióticos cuando está formando agregados [76]. Para esto, se evaluó la eficacia de una combinación de dos antibióticos (amikacina y carbenicilina) que poseen diferentes mecanismos de acción. También se evaluó la eficacia del tratamiento con un solo antibiótico (amikacina o gentamicina). La viabilidad de las bacterias se estudió mediante el uso del Kit de viabilidad celular BactLight. Este kit consiste en 2 sondas que reconocen ADN, la sonda verde fluorescente, SYTO9, que es permeable y entra en todas las bacterias, y la sonda rojo fluorescente, ioduro de propidio, que no es permeable y solo entra en células no viables con su membrana dañada, desplazando al SYTO9. Para evaluar la viabilidad de bacterias formando agregados que han sido expuestas a los dos antibióticos, se infectaron células MDCK crecidas sobre cubreobjetos con PAK y se incubaron por 2 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo las células fueron tratadas con amikacina 400µg/ml y carbenicilina 100 µg/ml en medio de cultivo durante 1 h y luego fueron marcadas con el kit de viabilidad celular. Como control se utilizaron células infectadas que no fueron tratadas con antibiótico. Las células sin fijar fueron inmediatamente analizadas mediante microscopía confocal. En el caso en que las bacterias no fueron expuestas al antibiótico, ninguna de las presentes en el agregado presentó marcación con ioduro de propidio. Sin embargo, puede verse una marca de ioduro proveniente de la célula apoptótica sobre la que se adhieren las bacterias (Figura 5.3, panel izquierdo). Por otro lado, en presencia de los antibióticos, el 89,23 ± 0,56 % de las bacterias presentaron marcación (Figura 5.3, panel derecho). Se observó el mismo efecto en células infectadas, tratadas con un solo antibiótico (amikacina o gentamicina).



**Figura 5.3. *P. aeruginosa* formando agregados es sensible al tratamiento con amikacina y carbenicilina.** Agregados de PAK, tratados o no, con una combinación de dos antibióticos. En verde se ven las bacterias vivas y en rojo se ven bacterias no viables. Barra de escala 5  $\mu$ m.

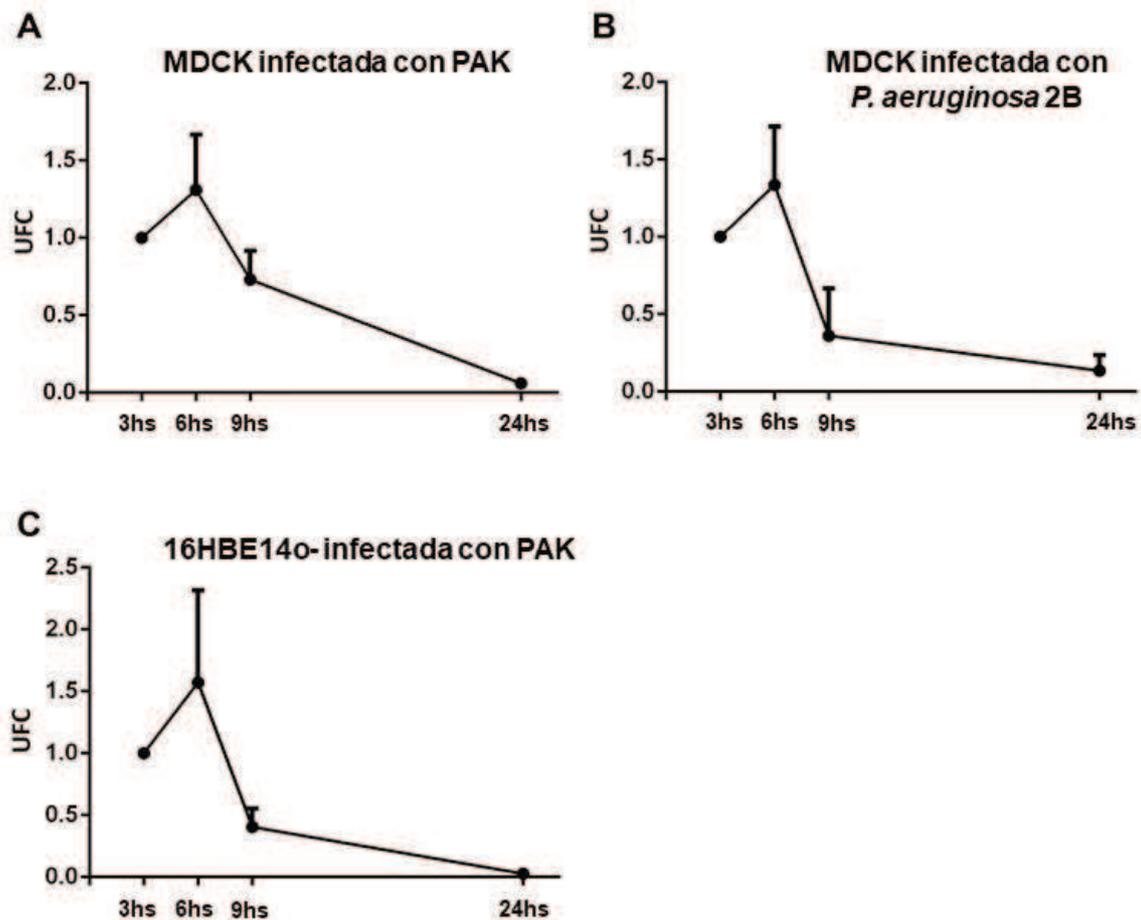
### 5.3. *P. aeruginosa* es eliminada dentro de las células epiteliales

Una vez comprobada la eficacia de los tratamientos, se procedió a hacer el ensayo de protección al antibiótico, para el cual, se infectaron células MDCK crecidas en placas de 6 pocillos con PAK (MOI 10) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego de 2 hs, el medio de cultivo fue lavado y las células fueron tratadas con la combinación de los 2 antibióticos por 1 h. Pasado ese tiempo, el antibiótico se retiró y se cambió por medio con un solo antibiótico en una dosis más baja (amikacina 40  $\mu$ g/ml), el cual se renovó a las 5 y 8 hs post-infección. Se lisaron las células a 3, 6, 9 y 24 hs luego de la infección y se sembraron los lisados en placas de LB-agar. Se contaron las unidades formadoras de colonias y se relativizaron a las que había a las 3 hs post-infección. También se sembraron diluciones del medio extracelular para asegurar que, de haber bacterias extracelulares, su número fuera, por lo menos, un orden de magnitud menor que el de las bacterias intracelulares. Cada punto se hizo por triplicado. Puede verse que el número de bacterias intracelulares aumenta a las 6 hs con respecto a lo que había a las 3 hs y luego desciende hasta llegar a casi desaparecer a las 24

hs (Figura 5.4A). Se estima que a las 3 hs post-infección, hay  $5 \times 10^5$  bacterias internalizadas por pocillo.

Para probar que este fenómeno no es específico de la cepa o de la línea celular utilizada, se realizó el mismo ensayo infectando células MDCK con *P. aeruginosa* 2B (Figura 5.4B) e infectando células 16HBE14o- con PAK (Figura 5.4C). En todos los casos se ve que existe un aumento del número intracelular de bacterias a las 6 hs y luego las bacterias intracelulares disminuyen a casi 0 a las 24 hs.

Se repitió la curva infectando células MDCK crecidas en filtros transwell con PAK. En ese caso también se vio que el recuento de bacterias intracelulares llega prácticamente a 0 a las 24 hs.

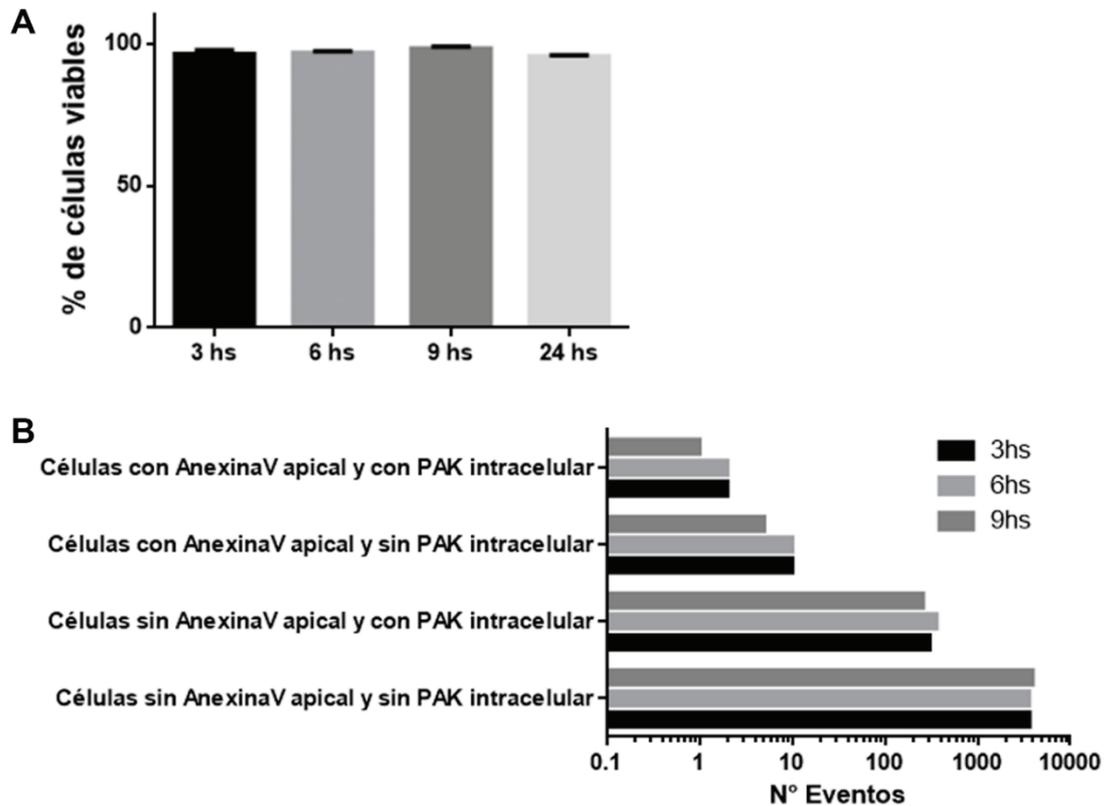


**Figura 5.4. *P. aeruginosa* es eliminada dentro de células epiteliales** Ensayo de protección al antibiótico. Células MDCK infectadas con PAK (A) o con *P. aeruginosa* cepa 2B (B) y células 16HBE14o- infectadas con PAK (C). El eje Y muestra las unidades formadoras de colonias relativizadas a las que había a las 3 hs. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM

#### **5.4. La viabilidad de las células epiteliales no se ve afectada por la presencia de la bacteria**

Finalmente, para evaluar si la disminución del número de bacterias intracelulares se debe a la muerte de éstas o a la muerte de las células que las contienen, se estudió la viabilidad de las células epiteliales infectadas a lo largo del tiempo. A los tiempos 3, 6, 9 y 24 hs post-infección, se hizo una inspección visual de los cultivos celulares infectados. No se observaron evidencias de muerte celular. Posteriormente, las células infectadas se despegaron de la placa con tripsina y se tiñeron con azul de tripán (Figura 5.5 A). Se vio que, para todos los tiempos, la viabilidad de las células epiteliales superaba el 95%. Este dato también muestra que las células se mantienen viables luego de haber sido incubadas 24 hs en medio de cultivo sin suero. Para reforzar este resultado, se estudió específicamente la viabilidad de las células que contienen bacterias internalizadas. Para lo cual células MDCK crecidas en filtros transwell se infectaron por 3, 6 y 9 hs con PAK-GFP, luego se tiñeron con AnexinaV-Alexa647 y se analizaron por microscopía confocal (Figura 5.5B). Se contaron las células que tenían bacterias internalizadas y las células que tenían tinción apical de AnexinaV-Alexa647 (Estadio 1), lo cual está asociado con etapas tempranas de apoptosis. Mediante una prueba de Chi cuadrado se estableció que la internalización de PAK-GFP y la presencia de tinción apical de AnexinaV-Alexa647 son variables independientes. Puede notarse, además, que el número total de células no varía a lo largo del tiempo, lo cual es importante, ya que esto demuestra que no hay una pérdida masiva de células en algún punto de la curva. Estos resultados muestran que la viabilidad de las células no se ve afectada por la presencia de las bacterias intracelulares.

En este capítulo observamos que *P. aeruginosa* se encuentra en vesículas LAMP1-positivas, y que un porcentaje alto de estas vesículas se acidifican, lo que sugiere que la bacteria se localiza en lisosomas maduros. También vimos que ésta es eliminada casi por completo luego de 24 hs. Se comprobó que esto es independiente de la línea celular y de la cepa de *Pseudomonas*. Finalmente, vimos que la presencia de bacterias intracelulares no afecta la viabilidad de las células epiteliales.



**Figura 5.5. La viabilidad de las células no se ve afectada por la presencia de *P. aeruginosa* intracelular.** A) Se evaluó la viabilidad de células MDCK infectadas con PAK a distintos tiempos post-infección mediante tinción con azul de tripán. Los datos están representados como la media  $\pm$  SEM. B) Se evaluó la viabilidad celular a distintos tiempos post-infección de células MDCK infectadas con PAK-GFP mediante la tinción con AnexinaV-Alexa647. Se cuantificó el número de células sin bacterias internalizadas ni tinción apical de AnexinaV, con tinción apical de AnexinaV, con bacterias internalizadas y con bacterias internalizadas y tinción apical de AnexinaV. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Chi-cuadrado.

La eliminación de *P. aeruginosa* mediante eferocitosis podría ser parte de un mecanismo de defensa. En individuos sanos, las células apoptóticas son rápidamente eferocitadas. En este contexto, *P. aeruginosa* encontraría pocas oportunidades de adherirse, pero si lo hiciera, sería internalizada y eliminada. Sin embargo, en contextos donde hay un gran número de células apoptóticas y/o una eferocitosis deficiente, *P. aeruginosa* podría tener una oportunidad de colonizar.

# CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

## 6. Conclusiones y discusión

### 6.1. *P. aeruginosa* se adhiere sobre células apoptóticas tardías

En esta tesis se demostró que las células apoptóticas extruidas del epitelio, sobre las que *P. aeruginosa* forma agregados, están en una etapa tardía del proceso de apoptosis. Esto se comprobó a través de diversos enfoques ya que las células que sirven de sustrato para la adhesión de esta bacteria no solo poseen características de apoptosis avanzada, como la degradación del ADN, sino que además carecen de otras características como la presencia de especies reactivas de oxígeno intracelulares, relacionadas con estadios tempranos del proceso de apoptosis. En individuos sanos, las células apoptóticas son rápidamente removidas y eliminadas, por lo que la presencia de células apoptóticas tardías es rara. La fibrosis quística es caracterizada por una inflamación exacerbada, daño tisular progresivo, y colonización bacteriana, principalmente en el tracto respiratorio. Como se mencionó en la introducción, la infección crónica pulmonar por *P. aeruginosa* es la principal causa de muerte asociada a esta enfermedad. Los individuos con fibrosis quística generalmente presentan un elevado número de células apoptóticas en las vías respiratorias. Si bien la razón no es completamente clara, las células epiteliales que poseen un CFTR mutado parecen ser más susceptibles a la apoptosis que las células que poseen el CFTR wt [77]. Por otro lado, también se ha reportado que la eferocitosis es deficiente en pacientes con esta enfermedad [40], por lo que sería posible encontrar células apoptóticas tardías, sobre las cuales las bacterias podrían colonizar. Este trabajo también es relevante en el contexto de las infecciones con *P. aeruginosa* en pacientes con heridas o quemaduras. Es sabido que esta bacteria es capaz de colonizar epitelios dañados [78,79]. Se ha explicado este fenómeno a partir de la afinidad de la bacteria por los marcadores basolaterales que exponen las células no polarizadas del borde de la zona de la herida. Las heridas y quemaduras poseen un gran número de células apoptóticas y necróticas, en este contexto, el tropismo de *P. aeruginosa* por células muertas podría ser otro factor importante que contribuya para la colonización del epitelio dañado.

## **6.2. El seguimiento individual de las bacterias con alta resolución temporal permitió estudiar fenómenos relevantes, inadvertidos con otro tipo de enfoques**

Los estudios de videomicroscopía confocal en un único plano permitieron aumentar la resolución temporal de nuestros videos, lo que nos permitió el seguimiento de bacterias individuales y la observación de fenómenos que, de otra forma, pasarían inadvertidos. Algunas de las conclusiones a las que arribamos gracias a la utilización de esta técnica fueron las siguientes: i) la dinámica de pegado en función del tiempo es diferente en las distintas zonas de la célula, ii) la incorporación de clumps es parte del proceso de formación de agregados, iii) las bacterias se adhieren por períodos cortos a las zonas de la superficie celular en las que no se produce acumulación de bacterias. Esto último sugiere que *P. aeruginosa* sensa las distintas superficies, pero sólo se adhiere a las que poseen determinadas características.

Todos estos estudios nos permiten indagar más profundamente en las primeras etapas de la formación de estructuras multicelulares bacterianas, lo que es importante ya que la transición de un estado planctónico a uno sésil, asociado a superficie, esta poco estudiado y resulta clave en los procesos infectivos. Por otro lado, la mayoría de los estudios de este tipo se llevaron a cabo sobre superficies abióticas, lo que resalta la importancia de nuestro trabajo, que estudia la interacción de la bacteria con sus células hospedadoras.

Otro resultado de este análisis es que las bacterias se adhieren por un extremo a la célula apoptótica. Si bien, más investigación en este tema es necesaria, estos resultados nos permiten indagar sobre la naturaleza de la adhesina que estaría mediando la unión de la bacteria a la célula apoptótica en los momentos iniciales de la infección. El pilus tipo IV es un apéndice bacteriano expuesto en la superficie de la célula que tiene localización polar en *P. aeruginosa*. Estas fibras están formadas principalmente por polímeros de la proteína pilina o PilA. El pilus es una adhesina particularmente importante para la virulencia ya que es requerida para la adhesión a células de mamífero durante las primeras etapas de la infección. Después de mediar la adhesión inicial, los pili se retraen, acercando la bacteria a la célula hospedadora, lo que permitiría una adherencia más íntima a cargo de otras adhesinas. Debido a la localización polar de los pili

y a su función como adhesina, especulamos que podría estar involucrado en la formación de agregados sobre células apoptóticas. En experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio, vimos que una mutante de *P. aeruginosa* que no posee pili (PAK  $\Delta$ PilA) es incapaz de formar agregados sobre las células apoptóticas.

Otra adhesina importante de ubicación polar es el flagelo. Nuestro grupo también vio que una cepa de *P. aeruginosa* que no posee flagelo (PAK  $\Delta$ FliC) es incapaz de formar agregados. Esto era esperable ya que la bacteria llega hasta la célula apoptótica de forma activa, impulsada por el flagelo. Sin embargo, no podemos descartar que esté también cumpliendo un rol como adhesina. En el laboratorio se está estudiando actualmente la función del flagelo y de los pili como adhesinas durante el proceso de agregación mediante el uso de cepas mutantes. Los resultados de estos estudios complementarán las observaciones realizadas mediante videomicroscopía en esta tesis.

### **6.3. *P. aeruginosa* se adhiere a zonas de la membrana plasmática con características morfológicas particulares**

Cuando se estudió la dinámica de la formación de agregados, se vio que la distribución de bacterias sobre la célula no es homogénea, sino que, existen zonas con más bacterias que otras. Estas observaciones nos llevaron a preguntarnos acerca de las características particulares de cada región celular. Vimos, que la superficie de la célula es heterogénea y que la distribución desigual de las bacterias coincide con el patrón celular. Podemos especular que cada zona particular presenta parches con distintas moléculas expuestas, las cuales pueden resultar más o menos atractivas para la bacteria. También podemos suponer que distintas regiones pueden tener diferente estructura, presentando mayor extensión, cavidades o invaginaciones, o incluso distinto grado de rugosidad. Mediante microscopía electrónica de barrido vimos que *P. aeruginosa* se une a células cuya membrana plasmática está segmentada en cuerpos apoptóticos. Observamos que, no sólo se adhiere exclusivamente a células que muestren esta característica, sino que también, en células que presentan zonas completamente cubiertas por cuerpos apoptóticos y zonas lisas, la bacteria se adhiere selectivamente en las zonas vesiculizadas. Se ha demostrado que

ciertas características de la superficie, como las cargas superficiales, la rigidez o la rugosidad pueden afectar la adhesión de bacterias y la posterior formación de biofilms [80]. Se ha postulado que las fuerzas de adhesión aumentan cuando se incrementa la rugosidad de la superficie. Sin embargo, otros grupos reportan resultados contrarios, en donde el aumento en la rugosidad no influencia o incluso inhibe, la adhesión de la bacteria [81]. Esta falta de consenso en la relación entre rugosidad de la superficie y la adhesión de bacterias podría ser atribuida a que la rugosidad, no describe las características topográficas de la superficie y que, estas características, pueden inhibir o promover la adhesión bacteriana y la formación de biofilms, dependiendo del tamaño, la forma y la densidad de las estructuras. Por ejemplo, el ala de la cigarra *Psaltoda claripennis* posee nanopilares, los cuales se ha descubierto que son letales para *P. aeruginosa*. Este efecto se debe a la estructura tridimensional del ala, y no a su composición química, ya que, al alterar las características químicas del ala mediante un recubrimiento con oro, no se vieron cambios en su efecto sobre la bacteria [81]. Es interesante especular entonces, que existen características morfológicas de la membrana de la célula que fomentan la formación de agregados. El estudio de las características estructurales de las superficies con la que interaccionan las bacterias, no solo nos permiten entender cuáles son las topografías que favorecen la formación de estructuras multicelulares, sino también, nos permiten identificar las características que inhiben la adhesión bacteriana, lo cual es importante desde el punto de vista del diseño de nuevas superficies. Cabe destacar que la mayoría de los estudios que describen la interacción de bacterias con superficies, fueron llevados adelante sobre superficies abióticas, por lo que el aporte de esta tesis se vuelve más significativo, ya que son pocos los trabajos que abordan este tema en superficie bióticas.

#### **6.4. La incorporación de clumps de bacterias previamente formados también contribuye a la formación del agregado**

A partir de estudios de videomicroscopía confocal, pudimos observar que la formación de los agregados puede verse determinada no solo por la adhesión de bacterias planctónicas, sino también por la unión de pequeñas estructuras

bacterianas multicelulares que se forman independientemente de la célula apoptótica (clumps).

En nuestro trabajo pudimos registrar la formación de estos clumps: parecen formarse por la asociación de bacterias planctónicas entre sí, aunque no descartamos que haya un sustrato que las aglutine. Registramos también la incorporación de los clumps a agregados formados sobre células apoptóticas. Se ha descrito anteriormente que estructuras multicelulares formadas por *P. aeruginosa*, pueden progresar a biofilms maduros, de los cuales, se desprenden clumps capaces de dar origen a nuevas estructuras multicelulares [82]. Sin embargo, el caso descrito en este trabajo es diferente, ya que los clumps no se desprenden de agregados más grandes, sino que se forman independientemente. También se ha descrito que las condiciones del medio donde las bacterias se mueven determinan que un biofilm se origine a partir de bacterias planctónicas individuales o a partir de pequeños agregados multicelulares [83]. Sin embargo, en nuestro sistema vimos que tanto bacterias individuales como clumps pueden formar parte del proceso de formación de los agregados. Si bien no observamos división bacteriana como parte del mecanismo de crecimiento del agregado, no podemos descartar que, en tiempos superiores a los que dura nuestro experimento, pueda ocurrir. Aunque es necesaria más investigación en el tema, estas observaciones podrían ayudar a comprender en detalle procesos de agregación de *P. aeruginosa* sobre células epiteliales.

Este trabajo contribuye a caracterizar en detalle la transición de *P. aeruginosa* desde un estado planctónico a uno multicelular en el contexto de la interacción con la barrera epitelial, lo cual resulta clave para comprender las primeras etapas en la formación de estructuras multicelulares bacterianas en procesos infectivos. En general, son pocos los modelos disponibles para estudiar esta transición en profundidad, especialmente en el contexto de la interacción con las células hospedadoras. En esta tesis se ha puesto a punto un método para seguir la formación de agregados. Esta metodología nos permite registrar el comportamiento de las bacterias individuales durante su agregación sobre células apoptóticas extruidas de la monocapa epitelial.

### **6.5. *P. aeruginosa* es internalizada en células epiteliales mediante eferocitosis**

En esta tesis vimos también que *P. aeruginosa* es internalizada dentro de células epiteliales mediante eferocitosis. Esto se evidencia porque la bacteria es encontrada dentro de células epiteliales junto con material apoptótico y porque al modular la eferocitosis, se ve afectada de igual manera la internalización de la bacteria. Hemos observado casos en que la bacteria se encuentra en células que no presentan material apoptótico, esto puede deberse a que la proteína fluorescente con la cual visualizamos las bacterias está en el citoplasma bacteriano, protegida de la acción de enzimas de la célula epitelial, sin embargo, en el caso del material apoptótico, el fluoróforo unido a la AnexinaV está expuesto al ambiente celular. Sin embargo, también podrían estar ocurriendo otros mecanismos de internalización de bacterias no asociados a eferocitosis.

Como mencionamos anteriormente, *P. aeruginosa* se adhiere a regiones de la superficie celular totalmente vesiculizadas. Podemos especular que la célula muerta debe estar escindida en cuerpos apoptóticos para poder ser internalizada por la célula viable, por lo que es probable que las células en estadios avanzados de apoptosis sean más fácilmente internalizadas. Los cuerpos apoptóticos sobre los que se adhiere la bacteria serían susceptibles de ser internalizados mediante eferocitosis, llevando con ellos a las bacterias adheridas.

Es interesante pensar que una célula que internaliza tanto material apoptótico como bacterias está recibiendo conjuntamente señales pro y anti-inflamatorias. Actualmente en nuestro laboratorio, se está estudiando la respuesta generada por macrófagos que procesan bacterias y material apoptótico en conjunto en comparación con macrófagos que internalizaron una cosa o la otra. Estos estudios pueden contribuir a comprender mejor cómo es la intersección de procesos que resultan clave en la respuesta inmune y en la resolución de la inflamación.

### **6.6. *P. aeruginosa* es eliminada intracelularmente**

Encontramos que una vez internalizada, la bacteria sigue el destino intracelular del material apoptótico eferocitado y es encontrada dentro de vesículas que

poseen características lisosomales, como la presencia de LAMP1 en su membrana y un pH ácido. Finalmente vimos que *P. aeruginosa* es eliminada intracelularmente, lo cual se evidencia a partir de la disminución del recuento intracelular de la bacteria a lo largo del tiempo. Es necesario destacar que existe una controversia acerca de la sobrevivencia intracelular de la *P. aeruginosa*, ya que, según algunos autores, la bacteria no solo sería capaz de sobrevivir dentro de la célula hospedadora, sino que también podría prosperar [51,52,56]. Estos resultados son contrarios a los postulados por otros grupos que afirman que la bacteria es incapaz de sobrevivir dentro de la célula [53–55]. En el contexto de esta controversia, debemos recalcar que nuestros experimentos se llevaron adelante en células polarizadas, a diferencia de otros estudios y que la bacteria, en nuestro sistema, no contacta directamente a la célula viva, ya que se adhiere a una célula muerta y luego es internalizada, vehiculizada por esta misma célula muerta. En este contexto, factores de virulencia, como los secretados por el sistema de secreción tipo III, no llegarían al citoplasma de la célula viva.

Nuestros resultados deberían completarse con estudios adicionales. Por ejemplo, la proteína GFP es sensible a pH ácido, por lo que podríamos estar subestimando el número de bacterias presentes en vesículas ácidas. Estos experimentos podrían complementarse en el futuro, utilizando marcadores que no sean sensibles al pH, o mediante la marcación de la bacteria con el anticuerpo anti-*pseudomonas*. Por otro lado, debido al diseño experimental de los ensayos de protección al antibiótico, en el cual el medio de cultivo extracelular está suplementado con antibiótico, no podemos descartar que exista una subpoblación de bacterias que se escapen de la célula, por lo que esta posibilidad deberá ser evaluada. Finalmente, podríamos estudiar la viabilidad de las bacterias internalizadas mediante microscopía confocal de fluorescencia, para complementar los resultados de los ensayos de protección al antibiótico.

#### **6.7. La eferocitosis juega un papel importante en la interacción de algunos patógenos con sus células hospedadoras**

La fibrosis quística está asociada con una eferocitosis ineficiente por fagocitos profesionales [50] y no profesionales [49]. Tanto el incremento en la apoptosis como la deficiencia en la eferocitosis pueden contribuir a que se genere un gran

número de células apoptóticas tardías, lo que podría favorecer la colonización por *P. aeruginosa*. La eferocitosis ineficiente afectaría la eliminación de la bacteria. La modulación de la eferocitosis podría ser un enfoque terapéutico atractivo ya que no solo contribuiría a disminuir la inflamación, sino también a la eliminación de la bacteria por este mecanismo.

La interacción entre eferocitosis y patogénesis bacteriana ha sido descrita previamente. En muchos casos se trata de patógenos dentro de células inmunes, que entran en apoptosis y son internalizadas por fagocitos profesionales. Luego, dos destinos son posibles: 1) el patógeno es eliminado dentro del fagocito, como en el caso de *Mycobacterium tuberculosis* [84,85]. 2) El patógeno utiliza el proceso de eferocitosis para alcanzar nuevas células hospedadoras, un ejemplo es el caso de *Leishmania major* [86]. Ambos ejemplos son discutidos en la introducción. El caso descrito en esta tesis presenta un caso diferente, donde la bacteria no se encuentra internalizada dentro de una célula apoptótica, sino que está adherida a la misma. Por otro lado, la bacteria es internalizada por fagocitos no profesionales.

La presencia de *P. aeruginosa* adheridas a células apoptóticas podría afectar el proceso de eferocitosis en fagocitos profesionales. Se describió previamente que receptores implicados en la remoción de patógenos pueden participar de la eliminación de células muertas, más que nada, células con la membrana celular dañada, como células apoptóticas tardías [87]. Se ha visto que enzimas como PI3K juegan un rol crítico en la eferocitosis y la entrada de patógenos. Durante la eferocitosis, la copa fagocítica de macrófagos se enriquece en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, un producto de PI3K [88]. Anteriormente hemos reportado que las protrusiones de membrana presentan en los sitios de agregación de *P. aeruginosa* están enriquecidas en PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> [67,89].

La eliminación de *P. aeruginosa* mediante eferocitosis podría ser parte del mecanismo de defensa frente a esta bacteria. En individuos sanos, las células apoptóticas son rápidamente eliminadas. En este contexto, *P. aeruginosa* encontraría pocas oportunidades de adherirse, y si lo hiciera, sería rápidamente eliminada. Sin embargo, en el contexto donde hay un gran número de células apoptóticas o una deficiente eferocitosis, *P. aeruginosa* podría tener una oportunidad de colonizar.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 7. Materiales y Métodos

### 7.1. Cepas bacterianas

Para este trabajo se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa* K, 2B y 6. La cepa *P. aeruginosa* K (PAK) proviene de un aislamiento humano, ha sido extensivamente estudiada por muchos laboratorios y es virulenta en modelos animales. Las cepas 2B y 6 corresponden a una cepa mucosa y a una no mucosa respectivamente, y provienen de aislamientos clínicos de pacientes con fibrosis quística [74]. Ambas cepas fueron generosamente cedidas por la Dra. Andrea Smania, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

En la siguiente tabla se detallan las cepas y plásmidos utilizados en esta tesis:

CEPA	PLÁSMIDO	NOMBRE	RESISTENCIA
PAK wt		PAK	
PAK wt	pMP7605-mCherry [90]	PAK-mCherry	Gentamicina
PAK wt	pNPT-GFP [91]	PAK-GFP	Carbenicilina
2B		2B	
2B	pMP7605-mCherry [90]	2B-mCherry	Gentamicina
6		6	

### 7.2. Crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* se creció en caldo Luria-Bertani a 37°C y 220 rpm de agitación durante toda la noche, tiempo en el cual el cultivo alcanza fase estacionaria. Los cultivos se utilizaron en la mañana posterior. En medio sólido las bacterias se crecieron en LB-agar 1,6%. Para las bacterias que lo requerían se agregó gentamicina (100 µg/ml) o carbenicilina (250 µg/ml) al medio.

### 7.3. Infección

Las células se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) 60 en el caso de estudios de microscopía confocal. Para los ensayos de videomicroscopía

confocal se utilizó una MOI 20 y para los experimentos que se analizaron por microscopía electrónica de barrido se utilizó MOI 60. Cuando se realizaron ensayos de protección al antibiótico se utilizó MOI 10. Todas las infecciones se realizaron en Minimum Essential Medium Eagle (MEM) sin suero fetal bovino ni antibiótico.

#### **7.4. Líneas celulares**

Para esta tesis se usaron las líneas celulares MDCK wt clon II, (generosamente cedida por el Dr. Keith Mostov), MDCK Lifeact-GFP (generosamente donada por los Dres. Liang Cai y Keith Mostov), que expresa un péptido de 17 aminoácidos fusionado a GFP que es capaz de unirse a filamentos de F-actina [92], y las líneas celulares MDCK Rac1N17 (Rac1 dominante negativo) y Rac1V12 (Rac1 constitutivamente activa) [93]. Ambas líneas celulares expresan Rac1 exógena en ausencia de doxiciclina, pero no en presencia de 20 ng/ml de la droga (Sistema Tet/off). La línea celular MDCK proviene del epitelio de túbulo renal de perro adulto y ha sido empleada repetidamente como modelo de células epiteliales polarizadas en estudios de infecciones bacterianas [58–64]. Se utilizó también la línea 16HBE14o- (generosamente cedida por el Dr. Alan Verkman), la cual corresponde a una línea celular transformada derivada de epitelio bronquial normal de humano. La presencia de micoplasma se controló periódicamente mediante PCR.

#### **7.5. Cultivo de las líneas celulares**

Las células MDCK wt y MDCK Lifeact-GFP se cultivaron en Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma Aldrich) suplementado con 5% de Suero Fetal Bovino (SFB, Natocor, Argentina). Las líneas celulares MDCK Rac1N17 y Rac1V12 se crecieron en MEM suplementado con 10% de SFB, Geneticina (G418) 500µg/ml (Sigma Aldrich) e Hygromicina B 200µg/ml (InvivoGen). Se incubaron con 20ng/ml de doxiciclina para inhibir la expresión del sistema Tet/off. Las células 16HBE14o- se cultivaron en MEM suplementado con 10% SFB. En

todos los casos, se agregó, al medio, penicilina-estreptomicina (ThermoFisher Scientific) a una concentración final de 10 U/ml.

Las células se mantuvieron en placas de cultivo de 100 mm con los medios correspondientes. Para realizar los pasajes las células se levantaron con tripsina-EDTA (Sigma Aldrich T4174).

Para los ensayos de inmunofluorescencia, las células se crecieron en filtros permeables transwell de 12 mm de diámetro (Corning Fisher, NY, USA). Se sembraron  $4,5 \times 10^5$  células MDCK en cada filtro transwell y se incubaron por 48 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para los ensayos de inmunofluorescencia con 16HBE14o- se sembraron  $1 \times 10^5$  células en cada transwell de 12 mm y se usaron después de 7 días en cultivo. El medio de cultivo se renovó cada 48 horas. Para los ensayos de protección al antibiótico, las células se cultivaron en placas de 6 pocillos ( $1 \times 10^6$  células/pocillo) y se crecieron por 24 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para los experimentos de videomicroscopía confocal se cultivaron  $1 \times 10^6$  células MDCK en placas de cultivo de 35 mm de diámetro con cubreobjetos de vidrio en el fondo (P35G-1.5-14-C MatTek corporation) y se incubaron por 72 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. El medio no se renovó para permitir la polarización. La infección se realizó en MEM con HEPES (MEM con 20mM de HEPES, se ajustó el pH final a 7,4 con NaOH 1M). Para comprobar la polarización de las células MDCK crecidas sobre vidrio y para los estudios de viabilidad bacteriana, las células se crecieron sobre cubreobjetos redondos en placas de 24 pocillos. Para ello se sembraron  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo y se incubaron por 72 hs a 37°C 5% CO<sub>2</sub> sin renovar el medio de cultivo. El crecimiento de las células MDCK sobre vidrio por periodos largos de tiempo sin renovación del medio de cultivo celular, permite la polarización de las células, la cual fue comprobada mediante la marcación con el anticuerpo anti-gp135.

## **7.6. Anticuerpos y reactivos**

AnexinaV-Alexa488 o AnexinaV-Alexa647, faloidina conjugada a rodamina o a Alexa647, CellMask Deep Red, TO-PRO3, el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BacLight (L7007), LysoTracker Red DND-99, el kit de proliferación celular CellTrace CFSE y los anticuerpos secundarios fueron adquiridos en

ThermoFisher Scientific. Los anticuerpos Anti-*P. aeruginosa* (ab68538) y anti-LAMP1 (24170) fueron adquiridos en AbCam. Anti-gp135 (monoclonal hecho en ratón) fue cedido generosamente por G. Ojakian [57]. H<sub>2</sub>DCFDA fue generosamente donado por el grupo Imbiomat del INIFTA, UNLP, AnexinaV sin conjugar fue adquirida en BD Pharmingen o producida en el laboratorio [75].

### **7.7. Generación de células apoptóticas *in vitro***

Para generar células apoptóticas, se utilizaron células MDCK crecidas en placas de cultivo de 100mm hasta confluencia. Se les retiró el medio y se les agregó 5 ml de MEM sin suero ni antibiótico y se las expuso a un pulso de UV de onda corta (6 mJ/cm<sup>2</sup>) por 1 minuto en un CL-100 Ultraviolet Crosslinker. Luego, se les agregó 5 ml más de medio y se las incubó por 12 hs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Alternativamente se generaron células apoptóticas incubando por 72 hs un cultivo de células MDCK con 100% de confluencia sin renovar el medio. Las células apoptóticas se recuperaron del sobrenadante mediante centrifugación a 300xG.

### **7.8. Tratamiento con AnexinaV**

Las muestras se lavaron con Binding Buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl y 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH=7,4) y se incubaron con AnexinaV por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para la tinción, se utilizó AnexinaV conjugada a Alexa488 o Alexa 647 (dilución 1/20 en Binding Buffer). En los casos en que se bloqueó la fosfatidilserina expuesta, se utilizó AnexinaV sin conjugar, (15 µg cada 100.000 células en Binding Buffer). En ambos casos, luego de la incubación con AnexinaV, las células se lavaron con MEM para retirar la proteína no unida.

### **7.9. Adición de células apoptóticas**

Para los ensayos de inmunofluorescencia se agregaron 5 células apoptóticas marcadas con AnexinaV conjugada cada 100 células MDCK crecidas en filtros transwell. Para los ensayos de citometría se agregaron 10 células apoptóticas

marcadas cada 100 células MDCK. Para los experimentos de protección al antibiótico en los que se agregaron células apoptóticas, éstas fueron incubadas con AnexinaV sin conjugar. Se usaron 6 células apoptóticas cada 100 células MDCK crecidas en filtros transwell. En los casos en que se infectó la monocapa, las bacterias se agregaron junto con las células apoptóticas.

#### **7.10. Preparación de muestras para inmunofluorescencia**

Las muestras se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente, se bloquearon con gelatina de piel de pescado (FSG) 0,7%, se permeabilizaron con Tritón X-100 0,1% y se incubaron toda una noche a 4°C con anticuerpo primario (Anti-LAMP dilución 1/400, Anti-*P. aeruginosa* dilución 1/100 y anti-gp135 dilución 1/1000) y por 1 h a 37°C con el anticuerpo secundario (dilución 1/1000) en cámara húmeda. Las muestras se tiñeron con faloidina (dilución 1/1000) por 1 h.

Las muestras marcadas con AnexinaV fueron lavadas con Binding Buffer y fijadas en paraformaldehído 4% en Binding Buffer por 15 minutos a temperatura ambiente [29]. De ser necesario, fueron permeabilizadas con saponina 0,025% en Binding Buffer (buffer de permeabilización) por 15 minutos y bloqueadas con seroalbumina bovina (BSA) 1% en buffer de permeabilización por 1 h.

Para los experimentos en los que se usó LysoTracker, las células se marcaron con la sonda a una concentración de 75nM y luego de 2 horas se fijaron con paraformaldehído 4% en PBS.

Para marcar las muestras con CFSE, las células se tripsinizaron, se centrifugaron y el pellet se resuspendió en PBS con CFSE 5µM. Luego se incubaron 15 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y se volvieron a centrifugar. El pellet se resuspendió en MEM con SFB y se incubó en la estufa por 10 minutos. Finalmente, las células se volvieron a centrifugar y se sembraron como se describió anteriormente.

Para la tinción de ADN, las células se fijaron, se permeabilizaron y luego se incubaron con TO-PRO3 (dilución 1/200) por 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad en cámara húmeda.

### **7.11. Adquisición de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia**

Las imágenes se adquirieron con un microscopio Olympus IX71 con un módulo confocal láser de fluorescencia Olympus FV1000 adjunto. Se usó un objetivo PlanApoN de inmersión en aceite (Magnificación 60X, Apertura numérica 1,42). Se utilizó una velocidad de adquisición de 4  $\mu$ segundos/píxel, una resolución de 1024x1024 píxeles y una separación de 0,25  $\mu$ m entre planos focales cuando se trabajó con muestras fijadas y una velocidad de adquisición de 2  $\mu$ segundos/píxel, una resolución de 800x800 píxeles y una separación de 0,30  $\mu$ m entre planos focales cuando se trabajó con muestras sin fijar. Para la adquisición de imágenes se utilizó el método secuencial con el que cuenta el equipo para evitar el “sangrado” de canal a canal que ocurre cuando los fluoróforos tienen perfiles espectrales superpuestos. Se eligieron campos recorriendo el preparado de manera sistemática, de forma tal de obtener imágenes de todas las zonas del mismo. Se tomaron un total de 10 imágenes por preparado, cada una de las cuales contiene aproximadamente 350 células.

### **7.12. Preparación de muestras y adquisición de imágenes por microscopía electrónica de barrido**

Células MDCK crecidas en filtros transwell se infectaron con PAK (MOI 60) por 1 h a 37°C y 5%CO<sub>2</sub>. Se incluyó un preparado sin infectar. Luego se lavó dos veces con buffer Sorensen 0,15M (0,056 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,144 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=7,2) y se fijó con glutaraldehído 2,5% en buffer Sorensen 0,1M (pH=7,2) por 1 h a temperatura ambiente. Luego se lavó nuevamente 2 veces con buffer Sorensen 0,15M y se realizó una deshidratación progresiva, incubando la muestra por 5 minutos a temperatura ambiente en distintas soluciones de concentración creciente de etanol en agua destilada (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 100%). Finalmente, se realizó el secado de punto crítico y el metalizado con oro. Las muestras se analizaron con un microscopio Carl Zeiss NTS Supra 40 [94].

### **7.13. Videomicroscopía confocal**

Se utilizaron células MDCK cultivadas en placas de 35 mm con un cubreobjetos N°1.5 de vidrio en el fondo. Las células fueron teñidas con AnexinaV-Alexa 647. Luego de la marcación, se agregó 0,5 ml de medio de infección (MEM con 20mM de HEPES, pH 7,4) a cada placa. Los videos se adquirieron con el microscopio confocal descrito anteriormente, el cual no posee cámara de control de temperatura, aun así, se corroboró que los agregados se formaran a temperatura ambiente (22°C). Se ajustaron los parámetros de adquisición en el microscopio (magnificación 60X, velocidad de adquisición: 2  $\mu$ segundos/píxel, zoom 4X, resolución: 800x800 píxeles). Se buscó un campo al azar con células apoptóticas extruidas y se enfocó el plano ecuatorial de la célula apoptótica. Para realizar la infección se tomó como guía el haz de luz del microscopio y se dejó caer la gota de cultivo bacteriano (PAK-GFP MOI 20) sobre el área iluminada. La adquisición comenzó inmediatamente después de la infección. Ambos canales (el correspondiente a bacterias expresando GFP y el correspondiente a células apoptóticas extruidas) se adquirieron en simultáneo por aproximadamente 15 minutos. Se tomó el mismo plano 800 veces a lo largo de ese tiempo (tiempo de adquisición por plano: 1,11 segundos).

### **7.14. Distribución espacial de las bacterias sobre la célula apoptótica**

Esta etapa del trabajo fue realizada en colaboración con el Dr. Fernando Peruani quien dirige el grupo de Física de Sistemas Biológicos, en Niza, Francia (<https://math.unice.fr/~peruani/research.html>). Los datos sobre la distribución espacial de las bacterias sobre células apoptóticas a lo largo del tiempo se analizaron utilizando Matlab.

### **7.15. Medición de la intensidad de fluorescencia de la marca de AnexinaV**

Para medir la intensidad de fluorescencia de la marca de AnexinaV-Alexa647 en las distintas porciones de una célula apoptótica se tomaron los videos generados por videomicroscopía confocal y se aplicó el macro “draw Circles And Quadrants”. Una vez generadas las áreas, se midió la intensidad de

fluorescencia del canal de la AnexinaV-Alexa647 (*Analyze/ Set Measurements/ Mean Gray Value/ Analyze/ Measure*) en cada región. El número de bacterias dentro de cada área se cuantificó de forma manual utilizando la herramienta del ImageJ Multi-Point Tool.

El macro fue generado por Olivier Burri: (<http://forum.imagej.net/t/dividing-circle-into-8-equal-areas/1995>).

#### **7.16. Medición de ERO intracelular**

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) intracelulares fue visualizada con la sonda H<sub>2</sub>DCFDA. Se trata de una forma de fluoresceína reducida químicamente que se utiliza como indicador de ERO. Se utilizaron células MDCK crecidas en filtros transwell. La infección se realizó con bacterias PAK-mCherry. Luego de la infección, las células se incubaron durante 2:30 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, tiempo después del cual, se retiró el medio celular, se lavó y se agregó H<sub>2</sub>DCFDA 10 µM y se incubó por 20 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Finalmente se agregó al medio CellMask (1/2000) y se incubó 10 minutos más. El preparado se montó sin fijar sobre un portaobjetos y se observó rápidamente al microscopio.

#### **7.17. Medición del contenido intracelular de ADN**

Para evaluar el contenido intracelular de ADN se utilizaron células MDCK crecidas en filtros transwell las cuales fueron marcadas con CFSE antes de ser sembradas. Se infectaron por 1 h con PAK-mCherry y luego se fijaron, permeabilizaron y marcaron con TO-PRO3

#### **7.18. Análisis de células apoptóticas por citometría**

Para analizar la estabilidad de la marcación con AnexinaV durante 3 hs en medio de cultivo, células MDCK apoptóticas generadas por irradiación con luz UV fueron teñidas con AnexinaV-Alexa647. Luego fueron centrifugadas a 250xG, el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en PFA 2% en Binding Buffer o en MEM sin SFB ni antibiótico. Las células en MEM se incubaron 3 hs a

37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las células en PFA 2%, se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y luego se centrifugaron y resuspendieron en 200 µl de Binding Buffer. Una vez fijadas, se mantuvieron en hielo y oscuridad hasta llevarlas al citómetro. Luego de 3 hs, las células apoptóticas incubadas en MEM, se fijaron y se resuspendieron en Binding Buffer. También se preparó un control de células sin teñir. Las células fueron resuspendidas a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/200 µl. Las mediciones se llevaron a cabo en un citómetro FACSAria II.

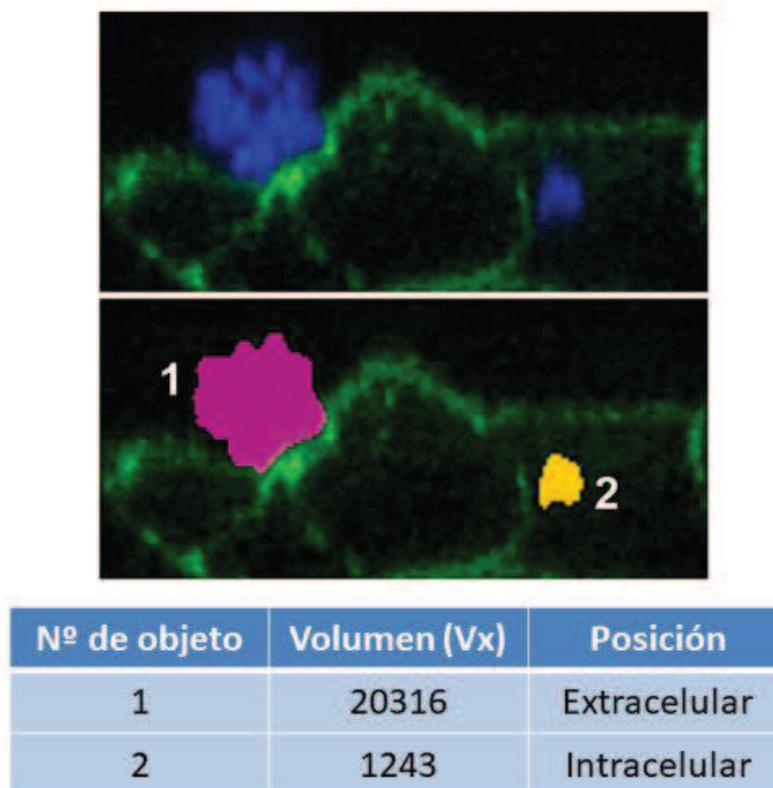
### **7.19. Cuantificación de la eferocitosis por citometría**

Para estos experimentos, se utilizaron células MDCK Lifeact-GFP crecidas sobre filtros transwell y células apoptóticas MDCK wt generadas por luz UV, teñidas con AnexinaV-Alexa647. Se analizaron 2 condiciones: células incubadas por 3 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> y células incubadas por 3 hs a 4°C. Cada condición se hizo por duplicado. A todos los filtros transwell se les agregó células apoptóticas teñidas con AnexinaV-Alexa647. Luego de la incubación, las células se levantaron con tripsina, se resuspendieron en MEM con SFB, se centrifugaron a 250xG, el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió en PFA 2% en Binding Buffer. Se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las células se prepararon según lo descrito previamente y se llevaron al citómetro. Se consideró como evento de eferocitosis a aquel que presenta señal positiva para ambos canales. La incubación a 4°C es un control de que lo que se está midiendo es internalización de material apoptótico y no material apoptótico adherido a la superficie de la célula, ya que la adhesión de las células apoptóticas a sus respectivos receptores en las células de la monocapa puede ocurrir a 4°C, sin embargo, la internalización del material apoptótico requiere que la temperatura sea de 37°C.

### **7.20. Cuantificación de la eferocitosis por microscopía**

La eferocitosis se cuantificó mediante análisis de imágenes, teniendo en cuenta el volumen de material apoptótico internalizado con relación al material

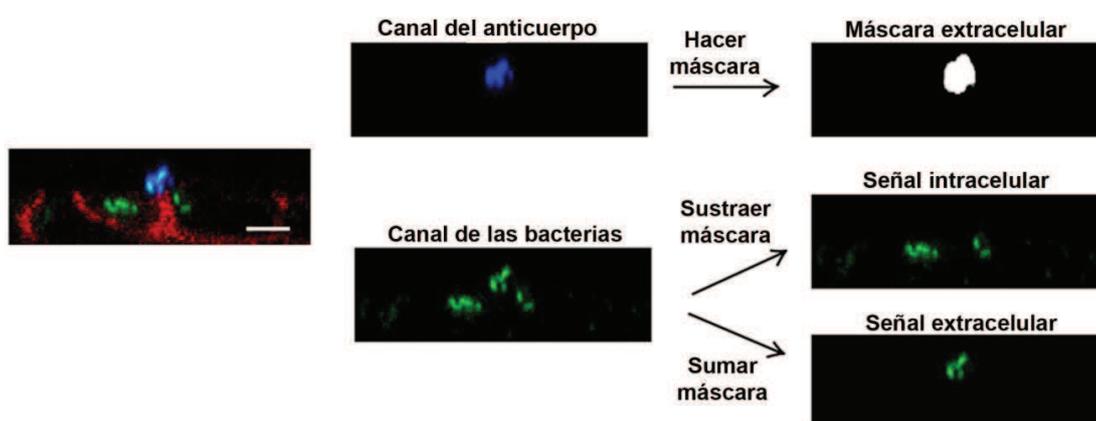
apoptótico total asociado a la monocapa. Stacks de imágenes de microscopía confocal (canal de las células apoptóticas) se analizaron con la herramienta “3D Object Counter” del programa ImageJ. Esta herramienta genera un mapa de objetos a partir de un umbral definido por el usuario en el que se establece un valor de intensidad a partir del cual un voxel (unidad cúbica de un objeto tridimensional donde cada cara corresponde a un pixel) se considera positivo. Esta herramienta genera objetos tridimensionales formados por voxels positivos adyacentes y les otorga un número de orden y un volumen, el cual se calcula como la suma de todos los voxels que forman al objeto. El mapa de objetos generados se superpuso con el canal de las células de la monocapa, y la ubicación intra o extracelular de cada objeto fue definida visualmente (Figura 7.1) [68].



**Figura 7.1. Cuantificación de la eferocitosis por microscopía.** Imagen superior: monocapa de células MDCK Lifeact-GFP (verde) con una célula apoptótica asociada y material apoptótico internalizado (azul). Imagen inferior: mapa de objetos generado por el 3D Object Counter a partir del canal de las células apoptóticas, superpuesto con el canal de las células viables. En la tabla se ve el número de a cada objeto, el volumen (medido en número de Voxels), el cual es un resultado de aplicar el 3D Object Counter y la ubicación de cada objeto (intracelular o extracelular) que fue definida visualmente.

## 7.21. Cuantificación de la internalización de bacterias por microscopía

La internalización de bacterias dentro de las células de la monocapa fue cuantificada con dos métodos distintos. 1) Por análisis de imágenes: se utilizó la herramienta 3D Object Counter de la misma forma en que se describió para la cuantificación de la eferocitosis. Cuando fue posible, se marcaron diferencialmente las bacterias extracelulares utilizando el anticuerpo anti-*P. aeruginosa* en muestras fijadas sin permeabilizar (Figura 7.2). La marcación diferencial de las bacterias extracelulares permite generar una máscara sobre el canal del anticuerpo, la cual se usa para seleccionar las bacterias intracelulares (restando al canal de las bacterias aquella fluorescencia que coincide con la máscara) o las bacterias extracelulares (teniendo en cuenta únicamente las bacterias cuya fluorescencia coincide con la máscara) [68].



**Figura 7.2. Cuantificación de bacterias intra y extracelulares.** Procedimiento seguido con el ImageJ para cuantificar diferencialmente bacterias intracelulares o extracelulares. En rojo pueden verse las células MDCK, en verde se observan las bacterias que expresan GFP, en azul se ven las bacterias extracelulares marcadas con el anticuerpo anti-*P. aeruginosa* y en blanco se ve la máscara generada con el ImageJ. Figura adaptada de Lepanto et. al. [68].

2) Contando las bacterias manualmente, en los experimentos en que fue necesario cuantificar las bacterias internalizadas asociadas a eventos de eferocitosis.

## **7.22. WesternBlot**

Células MDCK Rac1N17 y Rac1V12 crecidas sobre filtros transwell en ausencia y presencia de doxiciclina fueron lisadas. El lisado fue sonicado y luego centrifugado a máxima velocidad durante 30 minutos. Las proteínas del sobrenadante fueron precipitadas con ácido tricloroacético y resuspendidas en buffer de rehidratación. Se midió la concentración de proteínas mediante el test de Bradford, se ajustó la concentración a 1 µg/µl y se sembraron 17,5 µl en un gel de poliacrilamida. Las proteínas se transfirieron a una membrana y la membrana fue bloqueada con FSG 2% en TBS-T. Luego del bloqueo, la membrana fue incubada con anticuerpo anti-Rac1 (dilución 1/1000) durante toda la noche a 4°C. Luego se lavó, se incubó con anticuerpo secundario anti-mouse 800 (dilución 1/20.000) y se reveló.

## **7.23. Estudio de la viabilidad bacteriana**

La viabilidad bacteriana se evaluó mediante el uso del Kit LIVE/DEAD BacLight. Células MDCK crecidas sobre cubreobjetos redondos en placas de 24 pocillos durante 72 hs fueron infectadas con PAK (MOI 10) durante 2 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Pasado ese tiempo se retiró el medio, se lavó y se agregó una combinación de 2 antibióticos (Amikacina 400 µg/ml y Carbenicilina 100 µg/ml) que se dejó por 1 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad con una dilución 1/2000 de cada compuesto del kit (SYTO9 y Ioduro de Propidio) en PBS. Finalmente, los vidrios se montaron utilizando el medio de montaje proporcionado por el kit e, inmediatamente después, se llevaron al microscopio.

## **7.24. Ensayo de protección al antibiótico**

Los ensayos de protección al antibiótico se realizaron con células crecidas en placas de 6 pocillos (1x10<sup>6</sup> células /pocillo) y se infectaron con una MOI 10. Para estos ensayos se utilizaron células MDCK o células 16HBE14o-. La infección se realizó con las cepas de *P. aeruginosa* PAK o 2B. Luego de la infección, las células se incubaron durante 2 hs a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, tiempo después del cual,

se retiró el medio, se lavó y se agregó una combinación de 2 antibióticos (Amikacina 400 µg/ml y Carbenicilina 100 µg/ml) que se dejó por 1 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Después de ese tiempo, los pocillos que corresponden al tiempo “3 hs” se lavaron con PBS, las células se lisaron con Tritón X-100 0,25% y distintas diluciones del lisado celular se sembraron en placas de LB agar 1,6%. Al resto de los pocillos, que corresponden a tiempos posteriores, se los lavó con MEM y se les agregó MEM con Amikacina 40 µg/ml. El antibiótico se renovó a las 5 y 8 hs post-infección. Los lisados se realizaron a las 3, 6, 9 y 24 hs post-infección. Para todos los tiempos se sembraron diluciones del medio extracelular de los pocillos antes de realizar los lisados. Las placas de LB agar se incubaron durante toda la noche a 37°C.

En los experimentos de inhibición de la eferocitosis en que se agregaron células apoptóticas, las células se agregaron junto con las bacterias.

#### **7.25. Estudio de la viabilidad celular**

La viabilidad celular de cultivos infectados se evaluó mediante el ensayo de exclusión de azul de tripán, que distingue las células muertas de las vivas porque solo estas últimas excluyen al colorante. En este experimento, se siguió el mismo protocolo que se detalló para los ensayos de protección al antibiótico, pero en lugar de lisar las células a los tiempos especificados, las mismas fueron levantadas con tripsina e incubadas con azul de tripán. Alternativamente se evaluó si la presencia de bacterias internalizadas en una célula afectaba su viabilidad mediante la marcación con AnexinaV-Alexa647. En este caso, también se siguió el protocolo realizado para los ensayos de protección al antibiótico, pero a los tiempos especificados, las células se tiñeron con AnexinaV-Alexa647 y luego se fijaron y analizaron por microscopía confocal. Para este estudio se tuvieron en cuenta únicamente las células en estadio 1 de apoptosis [66].

#### **7.26. Análisis de imágenes**

Las imágenes se analizaron con el programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH, USA). Cuando esté indicado, los *stacks* de imágenes de

microscopia confocal de fluorescencia fueron proyectados a lo largo del eje z (Proyección XY), dando como resultado una imagen en la cual cada píxel representa el valor máximo de intensidad de los píxeles para esa posición x-y (*Image/Stacks/Z Project => Max intensity*). En el caso de los experimentos llevados a cabo con H<sub>2</sub>DCFDA, la proyección a lo largo del eje z se llevó adelante usando la función “Sum Slices”. Esta función suma todos los píxeles a lo largo del eje z para cada posición x-y (*Image/Stacks/Z Project => Sum Slices*). Para obtener el área sobre la cual calcular la intensidad de fluorescencia, se tomó sólo la célula apoptótica extruida, y se aplicó la función Sum Slices y luego la imagen resultante se separó en los distintos canales. El canal correspondiente al CellMask (que define el contorno de las células) fue utilizado para delimitar la célula apoptótica. Finalmente, la intensidad de fluorescencia fue calculada sobre el canal de la marca de DCF, utilizando el área delimitada con el canal del CellMask. Para calcular el background se midió la intensidad de fluorescencia promedio en un área donde no había células. Este valor fue restado al valor calculado de intensidad de fluorescencia de la célula apoptótica.

### **7.27. Análisis estadístico**

Los datos se muestran como Media  $\pm$  Error estándar de la media (SEM) de “N” experimentos independientes. ANOVA fueron llevados a cabo usando el programa GraphPad Prism versión 6.01. Dentro de los supuestos de la prueba de ANOVA se encuentran el de homogeneidad de varianza y la distribución normal de los datos. Los supuestos se corroboraron utilizando el Test de normalidad de Shapiro-Wilks y el Test F para comparar varianzas. Se consideró un nivel de significancia del 5% ( $\alpha=0,05$ ). El efecto de los factores sobre la proporción de material apoptótico y bacterias internalizadas se evaluó mediante un análisis de modelos lineales generalizados mixtos (GLMM) con estructura de error beta.

# BIBLIOGRAFÍA

## 8. Bibliografía

- [1] C.K. Stover, X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, L. Goltry, K. Smith, K.R. Folger, K. Larbig, R. Lim, J. Reizer, S. Westbrook-Wadman, D.J. Kowalik, P. Warrenner, D. Spencer, M. V. Olson, Y. Yuan, S.N. Coulter, S. Lory, A. Kas, M.J. Hickey, E. Tolentino, L.L. Brody, R.L. Garber, F.S.L. Brinkman, R.E.W. Hancock, W.O. Hufnagle, M. Lagrou, Z. Wu, M.H. Saier, G.K.-S. Wong, I.T. Paulsen, Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature*. 406 (2000) 959–964. <https://doi.org/10.1038/35023079>.
- [2] M.W. Silby, C. Winstanley, S.A.C. Godfrey, S.B. Levy, R.W. Jackson, *Pseudomonas* genomes: Diverse and adaptable, *FEMS Microbiol. Rev.* 35 (2011) 652–680. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00269.x>.
- [3] J. Sun, Z. Deng, A. Yan, Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 453 (2014) 254–267. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>.
- [4] J.A. Driscoll, S.L. Brody, M.H. Kollef, The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections, *Drugs*. 67 (2007) 351–368. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767030-00003>.
- [5] E. Giantsou, K.I. Manolas, Superinfections in *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia, *Minerva Anesthesiol.* 77 (2011) 964—970. <http://europepmc.org/abstract/MED/21952596>.
- [6] A.Y. Bhagirath, Y. Li, D. Somayajula, M. Dadashi, S. Badr, K. Duan, Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection, *BMC Pulm. Med.* 16 (2016) 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12890-016-0339-5>.
- [7] D. Church, S. Elsayed, O. Reid, B. Winston, R. Lindsay, Burn wound infections, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 403–434. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.403-434.2006>.
- [8] T. Bjarnsholt, K. Kirketerp-Møller, P.Ø. Jensen, K.G. Madsen, R. Phipps, K. Krogfelt, N. Høiby, M. Givskov, Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis, *Wound Repair Regen.* 16 (2008) 2–10. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x>.
- [9] C. Schwarzer, H. Fischer, T.E. Machen, Chemotaxis and Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to Scratch-Wounded Human Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells, *PLoS One*. 11 (2016) e0150109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150109>.
- [10] P.R. Sosnay, K.R. Siklosi, F. Van Goor, K. Kaniecki, H. Yu, N. Sharma, A.S. Ramalho, M.D. Amaral, R. Dorfman, J. Zielenski, D.L. Masica, R. Karchin, L. Millen, P.J. Thomas, G.P. Patrinos, M. Corey, M.H. Lewis, J.M. Rommens, C. Castellani, C.M. Penland, G.R. Cutting, Defining the disease liability of variants in the cystic fibrosis transmembrane

- conductance regulator gene, *Nat. Genet.* 45 (2013) 1160–1167. <https://doi.org/10.1038/ng.2745>.Defining.
- [11] M.D. Parkins, R. Somayaji, V.J. Waters, Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis, *Clin. Microbiol. Rev.* 31 (2018) 1–38. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-18>.
- [12] J.S. Elborn, Cystic Fibrosis, *Lancet.* 388 (2016) 2519–2531. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44548-1.00141-8>.
- [13] M. Hogardt, J. Heesemann, Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung, *Int. J. Med. Microbiol.* 300 (2010) 557–562. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.08.008>.
- [14] A. Bragonzi, D. Worlitzsch, G.B. Pier, P. Timpert, M. Ulrich, M. Hentzer, J.B. Andersen, M. Givskov, M. Conese, G. Döring, Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Expresses Alginate in the Lungs of Patients with Cystic Fibrosis and in a Mouse Model, *J Infect Dis.* 192 (2005) 410–419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>.
- [15] W.S. Chang, M. Van De Mortel, L. Nielsen, G.N. De Guzman, X. Li, L.J. Halverson, Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 8290–8299. <https://doi.org/10.1128/JB.00727-07>.
- [16] Z. Li, M.R. Kosorok, P.M. Farrell, A. Laxova, S.E.H. West, C.G. Green, M.J. Rock, M.L. Splaingard, Longitudinal Development of Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* Infection and Lung Disease Progression in Children With Cystic Fibrosis, *JAMA.* 293 (2005) 581–588.
- [17] R. Fernandez-Gonzalez, J.A. Zallen, Epithelial Organization: May the Force Be with You, *Curr. Biol.* 18 (2008) 163–165. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.026>.
- [18] H. Katoh, Y. Fujita, Epithelial homeostasis: Elimination by live cell extrusion, *Curr. Biol.* 22 (2012) R453–R455. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.04.036>.
- [19] S.A. Gudipaty, J. Rosenblatt, Epithelial Cell Extrusion: pathways and pathologies Swapna, *Semin Cell Dev Biol.* 67 (2017) 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.04.008>.
- [20] J. Rosenblatt, M.C. Raff, L.P. Cramer, An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism, (2001) 1847–1857.
- [21] D. Andrade, J. Rosenblatt, Apoptotic regulation of epithelial cellular extrusion, *Apoptosis.* 16 (2011) 491–501. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0587-z>.
- [22] G.T. Eisenhoffer, J. Rosenblatt, Bringing balance by force: Live cell extrusion controls epithelial cell numbers, *Trends Cell Biol.* 23 (2013) 185–192. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.11.006>.

- [23] S.A. Gudipaty, J. Rosenblatt, Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies, *Semin. Cell Dev. Biol.* 67 (2017) 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.05.010>.
- [24] D. Wlodkowic, W. Telford, J. Skommer, Z. Darzynkiewicz, Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death, *Methods Cell Biol.* 103 (2011) 55–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385493-3.00004-8>.Apoptosis.
- [25] P.D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling, *Cell Signal.* 24 (2012) 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>.Reactive.
- [26] S. Marchi, C. Giorgi, J.M. Suski, C. Agnoletto, A. Bononi, M. Bonora, E. De Marchi, S. Missiroli, S. Patergnani, F. Poletti, A. Rimessi, J. Duszynski, M.R. Wieckowski, P. Pinton, Mitochondria-Ros Crosstalk in the Control of Cell Death and Aging, *J. Signal Transduct.* 2012 (2012) 1–17. <https://doi.org/10.1155/2012/329635>.
- [27] H.-U. Simon, A. Haj-Yehia, F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis, *Apoptosis.* 5 (2000) 415–418. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9738234>.
- [28] R.A. Chaurio, C. Janko, L.E. Muñoz, B. Frey, M. Herrmann, U.S. Gaipf, Phospholipids: Key players in apoptosis and immune regulation, *Molecules.* 14 (2009) 4892–4914. <https://doi.org/10.3390/molecules14124892>.
- [29] H. Van Genderen, H. Kenis, P. Lux, L. Ungethüm, C. Maassen, N. Deckers, J. Narula, L. Hofstra, C. Reutelingsperger, In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 363–367. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.55>.
- [30] M. Ida, A. Satoh, I. Matsumoto, K. Kojima-Aikawa, Human annexin V binds to sulfatide: Contribution of regulation of blood coagulation, *J. Biochem.* 135 (2004) 583–588. <https://doi.org/10.1093/jb/mvh071>.
- [31] C. Segundo, F. Medina, C. Rodríguez, R. Martínez-Palencia, F. Leyva-Cobián, J.A. Brieva, Surface molecule loss and bleb formation by human germinal center B cells undergoing apoptosis: role of apoptotic blebs in monocyte chemotaxis, *Blood.* 94 (1999) 1012–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10419893>.
- [32] B. György, T.G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, É. Pállinger, E. Pap, Á. Kittel, G. Nagy, A. Falus, E.I. Buzás, Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 2667–2688. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>.
- [33] C.E. Fogarty, A. Bergmann, *The sound of silence: Signaling by apoptotic cells*, 1st ed., Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.013>.
- [34] S. Nagata, H. Nagase, K. Kawane, N. Mukae, H. Fukuyama, Degradation of chromosomal DNA during apoptosis, *Cell Death Differ.* 10 (2003) 108–

116. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401161>.

- [35] M.C. O'Brien, S.F. Healy, S.R. Raney, J.M. Hurst, B. Avner, A. Hanly, C. Mies, J.W. Freeman, C. Snow, S.K. Koester, W.E. Bolton, Discrimination of late apoptotic/necrotic cells (Type III) by flow cytometry in solid tumors, *Cytometry*. 28 (1997) 81–89. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19970501\)28:1<81::AID-CYTO10>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19970501)28:1<81::AID-CYTO10>3.0.CO;2-N).
- [36] Y.Y. Liang, T. Arnold, A. Michlmayr, D. Rainprecht, B. Perticevic, A. Spittler, R. Oehler, Serum-dependent processing of late apoptotic cells for enhanced efferocytosis, *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1264-8. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.210>.
- [37] J. Martinez, Prix Fixe: Efferocytosis as a Four-Course Meal, in: *Apoptotic Non-Apoptotic Cell Death*, 2015: pp. 1–36. <https://doi.org/10.1007/82>.
- [38] W. Li, Eat-me signals: Keys to molecular phagocyte biology and “appetite” control, *J Cell Physiol.* 227 (2012) 1291–1297. <https://doi.org/10.1002/jcp.22815.Eat-me>.
- [39] M. Nakaya, M. Tanaka, Y. Okabe, R. Hanayama, S. Nagata, Opposite effects of Rho family GTPases on engulfment of apoptotic cells by macrophages, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8836–8842. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510972200>.
- [40] V.R. William, H.P. M, D.I. S, Burying the Dead. The Impact of Failed Apoptotic Cell Removal (Efferocytosis) on Chronic Inflammatory Lung Disease, *Chest.* 129 (2006) 1673–1682. <https://doi.org/10.1378/chest.129.6.1673>.
- [41] D. Korn, S.C. Frasch, R. Fernandez-Boyanapalli, P.M. Henson, D.L. Bratton, Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation, *Front. Immunol.* 2 (2011) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00057>.
- [42] P.M. Henson, D.L. Bratton, Allergy: Airway epithelial rac1 suppresses allergic inflammation, *Curr. Biol.* 23 (2013) R104–R106. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.12.008>.
- [43] S. Arandjelovic, K.S. Ravichandran, Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 907–917. <https://doi.org/10.1038/ni.3253>.
- [44] R. Parnaik, M.C. Raff, J. Scholes, Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes, *Curr. Biol.* 10 (2000) 857–860. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00598-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00598-4).
- [45] C.J. Martin, K.N. Peters, S.M. Behar, Macrophages clean up: Efferocytosis and microbial control, *Curr. Opin. Microbiol.* 17 (2014) 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.10.007>.
- [46] A.C. Codo, A.C. Saraiva, L.L. dos Santos, M.F. Visconde, A.C. Gales, D.S. Zamboni, A.I. Medeiros, Inhibition of inflammasome activation by a clinical strain of *Klebsiella pneumoniae* impairs efferocytosis and leads to bacterial dissemination, *Cell Death Dis.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1214-5>.

- [47] M.A. Czuczman, R. Fattouh, J.M. Van Rijn, V. Canadien, S. Osborne, A.M. Muise, V.K. Kuchroo, D.E. Higgins, J.H. Brumell, *Listeria monocytogenes* exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread, *Nature*. 509 (2014) 230–234. <https://doi.org/10.1038/nature13168>.
- [48] T. Laskay, G. van Zandbergen, W. Solbach, Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?, *Trends Microbiol.* 11 (2003) 210–4. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00075-1).
- [49] R.W. Vandivier, T.R. Richens, S.A. Horstmann, A.M. DeCathelineau, M. Ghosh, S.D. Reynolds, Y.-Q. Xiao, D.W. Riches, J. Plumb, E. Vachon, G.P. Downey, P.M. Henson, Dysfunctional cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inhibits phagocytosis of apoptotic cells with proinflammatory consequences, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 297 (2009) L677–L686. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00030.2009>.
- [50] R. William Vandivier, V.A. Fadok, P.R. Hoffmann, D.L. Bratton, C. Penvari, K.K. Brown, J.D. Brain, F.J. Accurso, P.M. Henson, Elastase-mediated phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 661–670. <https://doi.org/10.1172/JCI200213572>.
- [51] A.A. Angus, A.A. Lee, D.K. Augustin, E.J. Lee, D.J. Evans, S.M.J. Fleiszig, *Pseudomonas aeruginosa* induces membrane blebs in epithelial cells, which are utilized as a niche for intracellular replication and motility, *Infect. Immun.* 76 (2008) 1992–2001. <https://doi.org/10.1128/IAI.01221-07>.
- [52] R. Garcia-Medina, W.M. Dunne, P.K. Singh, S.L. Brody, *Pseudomonas aeruginosa* acquires biofilm-like properties within airway epithelial cells, *Infect. Immun.* 73 (2005) 8298–8305. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.12.8298-8305.2005>.
- [53] M.C. De Assis, A.O. Da Costa, T.C. Barja-Fidalgo, M.C. Plotkowski, Human endothelial cells are activated by interferon- $\gamma$  plus tumour necrosis factor- $\alpha$  to kill intracellular *Pseudomonas aeruginosa*, *Immunology.* 101 (2000) 271–278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2000.00102.x>.
- [54] K.E.A. Darling, A. Dewar, T.J. Evans, Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in internalization of *Pseudomonas aeruginosa* by polarized respiratory epithelial cells, *Cell. Microbiol.* 6 (2004) 521–533. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00380.x>.
- [55] K. Yuan, C. Huang, J. Fox, D. Laturus, E. Carlson, B. Zhang, Q. Yin, H. Gao, M. Wu, Autophagy plays an essential role in the clearance of *Pseudomonas aeruginosa* by alveolar macrophages, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 507–515. <https://doi.org/10.1242/jcs.094573>.
- [56] Q. Deng, Y. Wang, Y. Zhang, M. Li, D. Li, X. Huang, Y. Wu, J. Pu, M. Wu, *Pseudomonas aeruginosa* triggers macrophage autophagy to escape intracellular killing by activation of the NLRP3 inflammasome, *Infect. Immun.* 84 (2015) 56–66. <https://doi.org/10.1128/iai.00945-15>.

- [57] Ojakian, Schwimmer, The Polarized Distribution of an Apical Cell Surface Glycoprotein Is Maintained by Interactions With the Cytoskeleton of Madin-Darby Canine Kidney Cells, *Biol. Cell.* 107 (1988) 2377–2387.
- [58] C.A. Lee, S. Falkow, The ability of Salmonella to enter mammalian cells is affected by bacterial growth state (bacterial invasion/Madin-Darby canine kidney cells/oxygen/stationary phase/oxrA), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 (1990) 4304–4308.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC54097/pdf/pnas01036-0290.pdf>.
- [59] B.B. Finlay, B. Gumbiner, S. Falkow, Penetration of Salmonella through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer, *J. Cell Biol.* 107 (1988) 221–230. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.1.221>.
- [60] Y. Hirakata, B.B. Finlay, D.A. Simpson, S. Kohno, S. Kamihira, D.P. Speert, Penetration of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* through MDCK Epithelial Cell Monolayers, *J. Infect. Dis.* 181 (2002) 765–769. <https://doi.org/10.1086/315276>.
- [61] M.A. Barocchi, A.I. Ko, M. Galva, K.L. McDonald, L.W. Riley, Rapid Translocation of Polarized MDCK Cell Monolayers by *Leptospira interrogans*, an Invasive but Nonintracellular Pathogen, *Infect. Immun.* 70 (2002) 6926–6932. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6926>.
- [62] Y. Duan, A.P. Liao, S. Kuppireddi, Z. Ye, M.J. Ciancio, J. Sun,  $\beta$ -Catenin activity negatively regulates bacteria-induced inflammation, *Lab. Investig.* 87 (2007) 613–624. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700545>.
- [63] R. Denkova, H. Strinska, Z. Denkova, G. Dobrev, D. Todorov, K. Mladenova, S. Shishkov, Study on the Adhesion of *Lactobacillus Plantarum* Strains With Probiotic Properties To Mdck, *J. Fac. Food Eng. XIII* (2014) 214–217. [www.fia.usv.ro/fiajournal](http://www.fia.usv.ro/fiajournal).
- [64] M. Eichner, J. Protze, A. Piontek, G. Krause, J. Piontek, Targeting and alteration of tight junctions by bacteria and their virulence factors such as *Clostridium perfringens* enterotoxin, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 469 (2017) 77–90. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1902-x>.
- [65] P. Lepanto, D.M. Bryant, J. Rossello, A. Datta, K.E. Mostov, A. Kierbel, *Pseudomonas aeruginosa* interacts with epithelial cells rapidly forming aggregates that are internalized by a lyn-dependent mechanism, *Cell. Microbiol.* 13 (2011) 1212–1222. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01611.x>.
- [66] D. Capasso, M.V. Pepe, J. Rossello, P. Lepanto, P. Arias, V. Salzman, A. Kierbel, Elimination of *Pseudomonas aeruginosa* through Efferocytosis upon Binding to Apoptotic Cells, *PLoS Pathog.* 12 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006068>.
- [67] A. Kierbel, A. Gassama-Diagne, K. Mostov, J.N. Engel, The Phosphoinositol-3-Kinase–Protein Kinase B/Akt Pathway Is Critical for *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAK Internalization, *Mol. Biol. Cell.* 16 (2005) 2577–2585. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>.

- [68] P. Lepanto, F. Lecumberry, J. Rossello, A. Kierbel, A confocal microscopy image analysis method to measure adhesion and internalization of *Pseudomonas aeruginosa* multicellular structures into epithelial cells, *Mol. Cell. Probes*. 28 (2014) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2013.10.001>.
- [69] L. Dario, N. Capasso, Formación de estructuras multicelulares de *Pseudomonas aeruginosa* sobre células apoptóticas, UNSAM, 2019.
- [70] S.E. F.S.D. and S.K. Balcarova-StAnder, J; Pfeiffer, Development of cell surface polarity in the epithelial Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line., 3 (1984) 2687–2694. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02194.x>.
- [71] J. Günther, H.M. Seyfert, The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells, *Semin. Immunopathol.* (2018) 555–565. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0701-1>.
- [72] M. Kitano, M. Nakaya, T. Nakamura, S. Nagata, M. Matsuda, Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation, *Nature*. 453 (2008) 241–245. <https://doi.org/10.1038/nature06857>.
- [73] J.B. Lyczak, C.L. Cannon, G.B. Pier, Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist, *Microbes Infect.* 2 (2000) 1051–1060. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01259-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01259-4).
- [74] S. Feliziani, A.M. Luján, A.J. Moyano, C. Sola, J.L. Bocco, P. Montanaro, L.F. Canigia, C.E. Argaraña, A.M. Smania, Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections, *PLoS One*. 5 (2010) 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012669>.
- [75] P.A. Arias, Producción de Anexina V recombinante y evaluación de su capacidad de unión a fosfatidilserina, Universidad Nacional de San Martín, 2016.
- [76] C.S. Tran, S.M. Rangel, H. Almlad, A. Kierbel, M. Givskov, T. Tolker-Nielsen, A.R. Hauser, J.N. Engel, The *Pseudomonas aeruginosa* Type III Translocon Is Required for Biofilm Formation at the Epithelial Barrier, *PLoS Pathog.* 10 (2014). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004479>.
- [77] R. Soleti, C. Porro, M.C. Martínez, Apoptotic process in cystic fibrosis cells, *Apoptosis*. 18 (2013) 1029–1038. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0874-y>.
- [78] P. Roger, E. Puchell, O. Bajolet-Laudinat, J.-M. Tournier, C. Debordeaux, M.-C. Plotkowski, J.H.M. Cohen, D. Sheppard, S. de Bentzmann, Fibronectin and  $\alpha 5\beta 1$  integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium, *Eur. Respir. J.* 13 (1999) 1301–1309. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3003.1999.13f14.x>.
- [79] J. Engel, Y. Eran, Subversion of mucosal barrier polarity by *Pseudomonas aeruginosa*, *Front. Microbiol.* 2 (2011) 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00114>.

- [80] F. Song, H. Koo, D. Ren, Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation, *J. Dent. Res.* 94 (2015) 1027–1034.
- [81] S. Wu, B. Zhang, Y. Liu, X. Suo, H. Li, Influence of surface topography on bacterial adhesion: A review, *Biointerphases.* 13 (2018) 060801. <https://doi.org/10.1116/1.5054057>.
- [82] S. Wilson, M.A. Hamilton, G.C. Hamilton, M.R. Schumann, P. Stoodley, Statistical quantification of detachment rates and size distributions of cell clumps from wild-type (PAO1) and cell signaling mutant (JP1) *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2004) 5847–5852. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5847-5852.2004>.
- [83] K.N. Kragh, J.B. Hutchison, G. Melaugh, C. Rodesney, A.E.L. Roberts, Y. Irie, P. Jensen, S.P. Diggle, R.J. Allen, V. Gordon, T. Bjarnsholt, Role of multicellular aggregates in biofilm formation, *MBio.* 7 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00237-16>.
- [84] M. Oddo, T. Renno, A. Attinger, T. Bakker, H.R. MacDonald, P.R. Meylan, Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Immunol.* 160 (1998) 5448–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9605147>.
- [85] M. Anthony, P. Laochumroonvorapong, G. Kaplan, Apoptosis, but Not Necrosis, of Infected Monocytes Is Coupled with Killing of Intracellular *Bacillus Calmette-Guerin*, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1499–1509. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051950>.
- [86] G. van Zandbergen, M. Klinger, A. Mueller, S. Dannenberg, A. Gebert, W. Solbach, T. Laskay, Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages, *J. Immunol.* 173 (2004) 6521–6525. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.11.6521>.
- [87] I.K.H. Poon, M.D. Hulett, C.R. Parish, Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance, *Cell Death Differ.* 17 (2010) 381–397. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.195>.
- [88] S. Mondal, S.G. Roy, F. Loison, Y. Li, Y. Jia, C. Harris, D.A. Williams, H.R. Luo, PTEN negatively regulates engulfment of apoptotic cells by modulating activation of Rac GTPase, *J Immunol.* 187 (2011) 5783–5794. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>.
- [89] A. Kierbel, A. Gassama-Diagne, C. Rocha, L. Radoshevich, J. Olson, K. Mostov, J. Engel, *Pseudomonas aeruginosa* exploits a PIP3-dependent pathway to transform apical into basolateral membrane, *J. Cell Biol.* 177 (2007) 21–27. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605142>.
- [90] E.L. Lagendijk, S. Validov, G.E.M. Lamers, S. De Weert, G. V. Bloemberg, Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies, *FEMS Microbiol. Lett.* 305 (2010) 81–90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.01916.x>.
- [91] I. Bucior, K. Mostov, J.N. Engel, *Pseudomonas aeruginosa*-mediated damage requires distinct receptors at the apical and basolateral surfaces

- of the polarized epithelium, *Infect. Immun.* 78 (2010) 939–953.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.01215-09>.
- [92] J. Riedl, Development and Characterization of Lifeact - a versatile marker for the visualization of F-actin -, 2010.
- [93] T.-S. Jou, W. James Nelson, Effects of Regulated Expression of Mutant RhoA and Rac1 Small GTPases on the Development of Epithelial (MDCK) Cell Polarity, *J. Cell Biol.* 142 (2002) 85–100.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.85>.
- [94] S. Burattini, E. Falcieri, Analysis of Cell Death by Electron Microscopy, in: *Necrosis Methods Protoc.*, 2013: pp. 77–89.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)41872-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)41872-7).

Este manuscrito corresponde a la última versión de la tesis e incluye las correcciones de los jurados



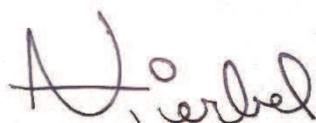
---

Firma tesista

María Victoria Pepe

---

Aclaración



---

Firma directora

Arlinet Kierbel

---

Aclaración