

Tesis Doctoral

Búsqueda y aislamiento de metabolitos secundarios en plantas y su caracterización como antiinflamatorio y antimicrobiano. Potencial uso de estos en pacientes con fibrosis quística

Mengoni, Eleonora Soledad

2016-04-06

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Mengoni, Eleonora Soledad. (2016-04-06). Búsqueda y aislamiento de metabolitos secundarios en plantas y su caracterización como antiinflamatorio y antimicrobiano. Potencial uso de estos en pacientes con fibrosis quística. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mengoni, Eleonora Soledad. "Búsqueda y aislamiento de metabolitos secundarios en plantas y su caracterización como antiinflamatorio y antimicrobiano. Potencial uso de estos en pacientes con fibrosis quística". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-04-06.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Búsqueda y aislamiento de metabolitos secundarios en plantas y su
caracterización como antiinflamatorio y antimicrobiano.
Potencial uso de estos en pacientes con fibrosis quística.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Química Biológica

Lic. Eleonora Soledad Mengoni

Directores de tesis: Dr. Adrián Vojnov - Dra. Ángeles Zorreguieta

Consejera de estudio: Dra. Ángeles Zorreguieta

Lugar de trabajo: Instituto de Ciencia y Tecnología Dr. César Milstein (CONICET)

Buenos Aires, 2016

RESUMEN

La Fibrosis Quística (FQ) es una enfermedad autosómica recesiva producida por mutaciones en el gen que codifica un canal para iones cloruro, el *CFTR*. La principal complicación a la que se enfrentan las personas que padecen FQ es el daño pulmonar crónico y progresivo causado principalmente por el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*. En esta tesis, se estudiaron compuestos provenientes de fuentes naturales con el objetivo de establecer si alguno de ellos poseía actividad antimicrobiana sobre *P. aeruginosa* PAO1 y/o anti-inflamatoria en modelos *in vitro* e *in vivo*. En una etapa preliminar, se empleó un extracto acuoso (RACU) y otro etanólico (RETOH) obtenidos a partir de hojas frescas de romero, y posteriormente se evaluaron sus compuestos mayoritarios: el ácido rosmarínico (RA), el ácido carnósico (CA) y el carnosol (CS). De todos, el CA, disminuyó el crecimiento de *P. aeruginosa* de manera dosis dependiente, potenció la actividad del antibiótico tobramicina, redujo la adhesión bacteriana a placas de poliestireno, e interfirió con la motilidad a concentraciones subinhibitorias. Mediante el uso de la cepa sensora de acil homoserina lactonas (AHLs), *C. violaceum* CV026, se observó que el CA afectó la producción de las AHLs C4-AHL, C6-AHL, C8-AHL y C12-AHL, responsables de la activación de genes reguladores del sistema *quorum sensing* (QS). En los ensayos de inflamación, tanto CA como el CS presentaron una importante actividad anti-inflamatoria tópica en modelos de ratón, corroborándose este efecto por estudios histopatológicos, y demostrándose por primera vez que el CA y el CS decrecen significativamente la expresión de IL-1 β y TNF- α , e inhiben completamente la expresión de COX-2. Otro compuesto estudiado fue el xilitol debido a que es empleado en la prevención de patologías relacionadas con la colonización bacteriana en las fauces y vías aéreas superiores, se hipotetizó sobre la posibilidad de que se pueda emplear para inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa*. Los resultados revelaron efectos pleiotrópicos del xilitol sobre los genes controlados por QS tanto en la producción de elastasa, piocianina, los movimientos de *swarming*, *twitching* y la formación de *biofilm*, sugiriendo que la producción de AHLs se encontraba afectada. El empleo de los plásmidos pME3853 (*lasI::LacZ*) y pME3846 (*rhII::LacZ*) en PAO1, permitieron demostrar la disminución de la producción de AHLs en presencia del xilitol. Por otra parte el cultivo de PAO1 crecido durante toda la noche en presencia de xilitol, se adhirió menos a las células epiteliales bronquiales Calu-3 crecidas en monocapa, disminuyendo el daño oxidativo producido por el proceso inflamatorio y la liberación de IL-8 por parte del epitelio bronquial comparado con el control (crecido sin xilitol).

En conclusión, esta tesis presenta evidencias sobre el potencial uso de compuestos bioactivos provenientes de plantas en la inhibición del crecimiento de microorganismos de difícil erradicación y los posibles mecanismos involucrados.

Palabras Claves: Fibrosis Quística, *Pseudomonas aeruginosa*, extracto de romero, ácido carnósico, ácido rosmarínico, carnosol, xilitol, *quorum sensing*.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease caused by mutations in the gene encoding the CFTR chloride channel. The main complication for people with CF is chronic and progressive lung damage caused mainly by the opportunistic pathogen, *P. aeruginosa*. In this thesis, natural compounds were studied in order to determine if these, had antimicrobial activity on *P. aeruginosa* PAO1 and/or anti-inflammatory activity in vitro and in vivo models. In the first stage, an aqueous (RACU) and ethanolic (RETOH) extracts, from fresh leaves of rosemary, and its main constituents such as rosmarinic acid (RA), carnosic acid (CA) and carnosol (CS) were studied. From these compounds, CA, not only reduced the growth of *P. aeruginosa* in a dose-dependent manner, but also enhanced the activity of tobramycin antibiotic. Also decreased adhesion on polystyrene plates, and interfered with bacterial motility at subinhibitory concentrations. However, the production of AHLs (C4-AHLs, C6-AHL, C8-C12-AHLs) molecules responsible for the activation of genes regulating system quorum sensing (QS), were increased by CA, when *C. violaceum* CV026 was employed. In inflammatory test, both CA and CS had higher topical anti-inflammatory activity in mouse models, being corroborated by histopathological studies and demonstrating for the first time that CA and CS decreased significantly, the expression of IL-1 β and TNF- α , and a complete inhibition of COX-2 expression. Subsequently, xylitol other natural component employed in the prevention of pathologies related to bacterial colonization of fauces and upper airways was studied. This compound showed pleiotropics effects on genes controlled by QS, such as elastase, pyocyanin, swarming, twitching and *biofilm*, suggesting that the production of AHLs were affected. To confirm this point, pME3853 (*lasI::LacZ*) and pME3846 (*rhlI::lacZ*) plasmids were employed in PAO1, confirming that AHLs expression were decreased. In vitro, the growing of PAO1 with xylitol, reduced the adhesion of the bacteria on bronchial epithelial Calu-3 cells, also reduced the oxidative damage and decreased significantly the IL-8 release by bronchial epithelium.

In conclusion, the plant kingdom offers a large number of components and bioactive compounds with its potential use against microorganisms where their eradication is difficult to control.

Keywords: Cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, rosemary extract, carnosic acid, rosmarinic acid, carnosol, xylitol, quorum sensing.

ABREVIATURAS

%	porcentaje
°C	grados Celsius
ACN	acetonitrilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
AHL	acil homoserin lactona
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	análisis de varianza
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ATP	adenosina trifosfato
CA	ácido carnósico
CFTR	regulador de la conductancia de transmembrana de la Fibrosis Quística
CIM	concentración inhibitoria mínima
Cl-	ión cloruro
CO₂	dióxido de carbono
COX-1	ciclooxigenasa 1
COX-2	ciclooxigenasa 2
CS	carnosol
CTCF	fluorescencia celular total corregida
D.O.	densidad óptica
DMEM	medio de cultivo Dulbecco
DMSO	dimetil sulfóxido
DNasa rh	desoxirribonucleasasa recombinante humana
EDTA	ácido etilen diamino tetraacético
et al.	et alia
EtOH	etanol
FQ	fibrosis quística
G3PDH	gliceraldehído-3-fosfato
h	hora
H₂DCFDA	diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceina
HPLC	cromatografía Líquida de Alta Presión, "High pressure liquid chromatography"
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular 1
IL-1β	interleuquina 1 β
IL-8	interleuquina 8
LB	Luria-Bertani
μg	microgramo
mg	miligramo
min	minutos

μl	microlitro
ml	mililitro
μm	micrometro
mm	milímetro
mM	millimolar
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
nm	nanometro
NOS	óxido nítrico sintetasa
ONPG	orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosida
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMA	forbol 13-acetato 12-miristato
PMS	metosulfato de fenazina
QS	quorum sensing
RA	ácido rosmarínico
RACU	extracto acuoso de romero
RETOH	extracto etanólico de romero
RNS	especies reactivas del nitrógeno "reactive nitrogen species"
ROS	especies reactivas del oxígeno "reactive oxygen species"
RT-PCR	RT-PCR transcripción reversa seguida de PCR
TLC	Cromatografía en capa delgada, "Thin layer chromatography"
TNF-α	tumor de necrosis tumoral alfa
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-δ-galactopiranosido
Xy	xilitol

Bueno tesis he terminado contigo.....No sé cómo lo logré pero llegué al final del camino. Luego de retomarte más de mil veces decidí ponerte punto final y acá estamos. Por suerte siempre hubo gente que me apoyo y acompañó durante este largo camino, por ello quiero que cada uno esté presente en este apartado especial para darle las gracias....

A mi director de tesis Adrián Vojnov, quien fue quien me alentó desde el primer día que ingrese a su grupo de trabajo; por su buena predisposición, sus consejos y su paciencia. Por escucharme y aconsejarme afectuosamente. Que me doctore ha sido por su impulso su convicción y confianza hacia mí. Muchas gracias Adrián!

Quiero agradecer especialmente a Ángeles, quien me permitió ser su doctoranda, por ayudarme con la finalización de este libro. Sus correcciones y aportes fueron muy importante para mí.

A las chicas del labo, Flor, Vale y Laila, con quienes compartí y sigo compartiendo charlas, risas y proyectos. Durante esos años siempre se vivió un excelente clima de trabajo. Gracias por alentarme siempre y escuchar mis alegrías y mis penas. Excelentes amigas y compañeras. Me llevo los mejores recuerdos de esos momentos compartidos.

A Pablo Torres y Luciano Rigano, por aportarme su conocimiento científico y brindarme su compañerismo. Por abrir las puertas de sus casas y estar siempre dispuestos a ayudarme.

A Andy Dugour con quien intercambiamos ideas, experimentos y logros. Por querer realizar junto conmigo una y mil veces proyectos, que aunque no se concreten, nunca dejamos de delirar con ellos. Me llevo una amiga y una gran co-equiper.

Al Dr. Juan M. Figueroa, por compartir conmigo su mirada de la ciencia puesta al servicio del paciente.

A la gente linda del Dep. Médico de Genética Médica ANLIS-Malbrán que hicieron mi estadía por el laboratorio muy amena. A Ceci Luna, Marce, Roxana, Pato, Eduardo C. y Fabi por ser tan buena gente conmigo. Al Dr. Pivetta y a Ceci por permitirme realizar la tesis en el laboratorio de Adrián.

A mi amiga Mime, donde el alentarnos a continuar por este camino fue mutuo. Por apoyarme siempre con cualquier locura que se me ocurriese en el ámbito laboral.

A mis papás y hermana, mejor familia hubiese sido imposible tener. Cualquier mención no alcanzaría las páginas de esta tesis.

A Leandro, por sus mimos, paciencia y por conjugar los mundos tan diferentes que tenemos. Por venir a mi vida en el momento oportuno. Por ser tan buen compañero, amigo, amor y confidente. Por quererme sencillamente.

A la persona más importante de mi vida, a vos hija, por ser mi motor de búsqueda, mi compañera, mi amor más importante. No habrá corazón en este mundo que pueda amarte más que el mío. Eternamente agradecida a Dios por tenerte a mi lado.

Mi reconocimiento:

- A la Fundación Pablo Cassará, Centro de Ciencia y Tecnología Dr. Cesar Milstein y Departamento de Genética Médica ANLIS-MALBRAN
- A la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo económico que me brindaron para poder realizar el presente trabajo.
- Al Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA.

PUBLICACIONES

Mengoni ES, Vichera G, Rigano LA, Rodriguez-Puebla ML, Galliano SR, Cafferata EE, Pivetta OH, Moreno S, Vojnov AA. **Suppression of COX-2, IL-1 β and TNF- α expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from Rosmarinus officinalis L.** Fitoterapia. 2011 Apr;82(3):414-21.

En preparación

Mengoni ES, and VojnovAA. **Xylitol affects virulence factors production and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa PA01 by quorum sensing interference**

Mengoni ES, and Vojnov AA .Effect of Carnosic Acid on Swimming and Twitching Motilities, Pyocyanin Virulence Factor Production and Antibiotic Susceptibility in Pseudomonas aeruginosa PAO1.

A mi padres Emidio y Dilma

A mi amada hija Valentina

INDICE

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN.....	1
1.FIBROSIS QUÍSTICA. PERSPECTIVA DE LA ENFERMEDAD.....	2
1.1.ASPECTOS CLÍNICOS DE LA FQ	3
1.1.1.Fisiopatología y manifestaciones clínicas de la enfermedad.....	3
1.1.2.Infecciones e inflamación pulmonar.....	4
1.2.TERAPIAS EXISTENTES PARA FQ	6
1.2.1.Despeje de las vías respiratorias (“ <i>Airway clearance</i> ”).....	6
1.2.2.Terapia con antibióticos	6
1.2.3.Tratamiento con DNasa	7
1.2.4.Terapia anti-inflamatoria.....	7
1.3. <i>P. aeruginosa</i> : su implicancia como organismo patógeno oportunista.....	7
1.3.1.Generalidades	7
1.3.2.Factores de virulencia implicados en la infección aguda	9
1.3.3.Factores implicados en la adherencia y motilidad	10
1.3.4.Factores implicados en la colonización dependientes del “ <i>Quorum sensing</i> ”	11
1.3.5.Factores implicados en la colonización independientes del “ <i>Quorum sensing</i> ”	12
1.3.6.Factores de <i>P. aeruginosa</i> de virulencia implicados en la infección crónica.....	13
1.3.7.El <i>biofilm</i> como factor de resistencia de <i>P. aeruginosa</i>	13
1.4.QUORUM SENSING: El poder de la cooperación en el mundo de <i>P. aeruginosa</i>	15
1.4.1.Breve reseña	15
1.4.2.El sistema de comunicación célula-célula en <i>P. aeruginosa</i>	16
1.4.3.Rol del quorum sensing en la interacción hospedador-patógeno.....	18
1.4.4. <i>Quorum sensing</i> como blanco en una terapia antimicrobiana.....	19
1.5.SUSTANCIAS PROCEDENTES DE PLANTAS CON ACCIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTINFLAMATORIA.....	20
1.5.1.Antecedentes	22
1.5.2.Xilitol.....	24
HIPOTESIS	27
OBJETIVOS.....	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
CAPÍTULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
2.CULTIVOS PROCARIOTAS Y CONDICIONES DE CULTIVO	32
2.1.Cepas Bacterianas	32
2.2.Condiciones de cultivo y conservación de cepas.....	32
2.3.LÍNEA CELULAR	32

2.3.1.Línea celular murina.....	32
2.3.2.Línea celular humana.....	33
2.4.CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO DE LAS CÉLULAS.....	33
2.4.1.Descongelamiento.....	33
2.4.2.Congelamiento.....	33
2.4.3.Compuestos y reactivos empleados.....	33
2.4.4.Preparación de los extractos de romero.....	34
2.5.ENSAYO DE VIABILIDAD.....	34
2.6.DETERMINACIÓN DE FORMACIÓN DE BIOFILM Y TINCIÓN CON CRISTAL VIOLETA.....	34
2.7.SUSCEPTIBILIDAD DEL BIOFILM FORMADO POR PAO1 EN PRESENCIA DE CA Y TOBRAMICINA.....	35
2.8.ENSAYOS DE MOTILIDAD.....	35
2.8.1. <i>Swimming</i> y <i>swarming</i>	35
2.8.2. <i>Twitching</i>	36
2.8.3.Ensayo de <i>swarming</i> empleando filtros de papel impregnados con CA.....	36
2.9.MEDICIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA.....	36
2.9.1.Extracción de pirocianina.....	36
2.9.2.Medición de la actividad de las proteasa.....	37
2.9.3.Ensayo de actividad de LasA en sobrenadantes de PAO1.....	37
2.9.4.Ensayo de elastasa LasB.....	37
2.10.OBTENCIÓN Y DETECCIÓN DE AHL.....	38
2.10.1.Extracción de AHLs a partir de un cultivo de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	38
2.10.2.Cromatografía en placa delgada.....	38
2.10.3.Ensayo de β -galactosidasa.....	38
2.11.PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES PROCARIOTAS.....	39
2.11.1.Condiciones de cultivo.....	39
2.11.2.Preparación de ADN plasmídico.....	40
2.11.3.Transformación de células electrocompetentes.....	40
2.12.CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	40
2.13.EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA IN VIVO.....	40
2.13.1.Consideraciones bioéticas:.....	40
2.13.2.Modelo de edema plantar inducido por formaldeído.....	41
2.13.3.Modelo de edema de oreja de ratón.....	42
2.13.4.Ensayo de irritabilidad dérmica.....	43
2.14.PREPARACIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc.....	43
2.14.1.Extracción de ARN.....	43
2.14.2.Síntesis de ADNc.....	43
2.14.3.Análisis por RT- PCR.....	44
2.14.4.Geles de agarosa.....	45

2.15. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE NITRITOS EN LA LÍNEA CELULAR RAW 264.7.....	46
2.16. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	46
2.17. ENSAYO DE ADHESIÓN BACTERIANA SOBRE CÉLULAS CALU-3.....	46
2.18. ENSAYO DE TOXICIDAD MTS.....	47
2.19. MEDICIÓN DE MEDIADORES INFLAMATORIOS EN CALU3.....	47
2.19.1. Medición de nitritos.....	47
2.19.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) en Calu-3 mediante microscopía de fluorescencia.....	48
2.20. MEDICIÓN DE IL-8.....	48
2.21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	48
CAPÍTULO III	
3. ESTUDIO DE <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> Y COMPUESTOS AISLADOS DE ESTA PLANTA SOBRE <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1.....	50
3.1. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS POR HPLC DE LOS EXTRACTOS DE ROMERO.....	51
3.2. ANÁLISIS SOBRE LOS EFECTOS DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS FRESCAS DE ROMERO.....	53
3.2.1. Ensayo sobre el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	53
3.2.2. Estudio del romero sobre aislamientos clínicos provenientes de pacientes con FQ.....	54
3.2.3. El RETOH potencia la acción de los antibióticos a dosis subinhibitorias sobre PAO1 en forma plactónica.....	56
3.3. ESTUDIO DEL <i>BIOFILM</i> FORMADO POR <i>P. AERUGINOSA</i> EN PRESENCIA DE ÁCIDO CARNÓSIDICO.....	58
3.3.1. El CA a bajas concentraciones afecta la formación de <i>biofilm</i> de PAO1.....	58
3.4. EL CA AFECTA LOS MOVIMIENTOS DE <i>SWARMING</i> Y <i>TWITCHING</i> PERO NO DE <i>SWIMMING</i> DE <i>P. AERUGINOSA</i> PAO1.....	61
3.4.1. El CA inhibe el <i>swarming</i> pero no el <i>swimming</i>	61
3.4.2. El <i>twitching</i> de PAO1 es inhibido por CA de manera dosis dependiente.....	64
3.4.3. El CA afectaría el QS de PAO1 ocasionando la sobreproducción de AHLs.....	66
CAPITULO IV	
4. ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA DE <i>R. OFFICINALIS</i> Y DE LOS COMPUESTOS AISLADOS DE ÉL <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	69
4.1. Acción antiinflamatoria del RETOH y de los compuestos aislados de él: estudios <i>in vivo</i>	69
4.1.1. La aplicación tópica de RETOH reduce la inflamación <i>in vivo</i> en el modelo plantar inducido con formaldehído y no tiene propiedades irritantes en piel de conejo.....	69
4.2. EL RETOH DE HOJAS FRESCAS DE ROMERO ENRIQUECIDO DE CA Y CS, INHIBE EL PROCESO DE INFLAMACIÓN CON IGUAL EFICACIA QUE LA DROGA COMERCIAL INDOMETACINA.....	71
4.3. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICOS Y DE OREJAS DE RATÓN TRATADAS CON RETOH y CA.....	73

4.4.MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIINFLAMATORIA DEL REOH, CA Y CS: ESTUDIOS INVITRO.....	74
4.4.1.La liberación de NO ₂ , en macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados por LPS, disminuye en presencia de RETOH, CA y CS de manera dosis dependiente.	74
4.5.EFECTO DEL CA Y CS SOBRE LA EXPRESIÓN MOLÉCULAS PRO- INFLAMATORIAS.....	75
CAPÍTULO V	
5. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL XILITOL SOBRE PAO1 Y CALU-3, COMO POTENCIAL USO EN PACIENTES PACIENTES CON FQ.....	78
5.1.El xilitol impide la producción de piocianina de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 sin afectar su crecimiento	79
5.2.El xilitol afecta la formación del <i>biofilm</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	80
5.3.EL XILITOL REDUCE LA LIBERACIÓN DE PROTEASAS AL MEDIO EXTRACELULAR	81
5.4.EL XILITOL AFECTA LA ACCIÓN DE LASB PERO NO LA ACTIVIDAD DE LASA.....	82
5.5.EL XILITOL AFECTA LOS MOVIMIENTOS DE <i>SWARMING</i> Y EL <i>TWITCHING</i> PERO NO EL <i>SWIMMING</i> DE PAO1	84
5.6.PRODUCCIÓN DE RAMNOLÍPIDOS EN PRESENCIA DE DISTINTAS DOSIS DE XILITOL.....	85
5.7.ACCIÓN DEL XILITOL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA POR INTERFERENCIA EN LA REGULACIÓN GÉNICA DEL SISTEMA DE QS	86
5.8.EFECTO DEL XILITOL EN LA ADHESIÓN DEP. AERUGINOSA SOBRE LA LÍNEA RESPIRATORIA CALU-3.....	88
5.8.1. Descripción del tipo celular utilizado en el estudio	88
5.8.2. El tratamiento de PAO1 con xilitol disminuye la adhesión a las células Calu-3.....	90
5.8.3. Efecto del sobrenadante de <i>P. aeruginosa</i> sobre la viabilidad celular y de la adhesión de la línea Calu-3.	91
5.8.4. El tratamiento de la cepa PAO1 con Xilitol disminuye la producción de radicales por las células Calu-3	93
5.8.5. Medición del factor pro-inflamatorio IL-8 en Calu-3 expuestas a sobrenadante de PAO1.....	96
CAPÍTULO VI	
DISCUSIÓN	99
CAPÍTULO VII	
REFERENCIAS.....	106

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. FIBROSIS QUÍSTICA. PERSPECTIVA DE LA ENFERMEDAD

La Fibrosis Quística (FQ) es la enfermedad de transmisión autosómica recesiva más frecuente y severa en la población americana de origen europeo (caucásica), y es la causa más importante de enfermedad pulmonar crónica y de insuficiencia pancreática exocrina en las tres primeras décadas de vida. Se estima que 1 de cada 3200 nacidos vivos padece esta enfermedad (CFW 2002, WHO 2012) variando la incidencia en los diferentes grupos étnicos, por ejemplo en los afro-americanos es mucho menos frecuente, sólo 1 de cada 15.300 nacidos vivos son diagnosticados con FQ (Hamosh et al 1998). También se ha reportado casos en poblaciones indígenas americanas y asiáticos, pero con muy baja incidencia (1 en 90.000 nacidos vivos) (Grebe et al 1992, Powers et al 1996). Según los datos aportados por las asociaciones de FQ de Argentina, en nuestro país nacen alrededor de 300 a 400 niños por año con ésta afección, y sólo el 5% es detectado precozmente (www.fipan.org.ar).

El origen de la FQ se debe a mutaciones en el gen *CFTR* (siglas de "Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator"). El mismo fue aislado por Riordan en el año 1989 (Riordan et al, 1989) por clonado posicional localizándolo en el brazo largo del cromosoma 7 (7q31). El gen contiene 27 exones que cubren una región de 250 kilobases (Kb) y codifican un ARN mensajero maduro (ARNm) de 6,5 Kb (Rommens et al 1989).

La proteína codificada por el gen *CFTR* funciona como canal de transporte de iones Cl^- a través de la membrana apical de células epiteliales, principalmente del páncreas, glándulas salivares, glándulas sudoríparas, pulmón y tractos gastrointestinal y genitourinario (Figura 1.1) (Bradbury 1999). La actividad de transporte de Cl^- por el *CFTR* es regulada por AMP cíclico (AMPC) (Anderson et al 1991), principal característica que lo diferencia de otros canales de Cl^- . Por lo tanto, la deficiencia en la función del *CFTR*, da como resultado la regulación anormal de los electrolitos y el desequilibrio de la composición de los fluidos que rodean los tejidos (Quinton 1983).

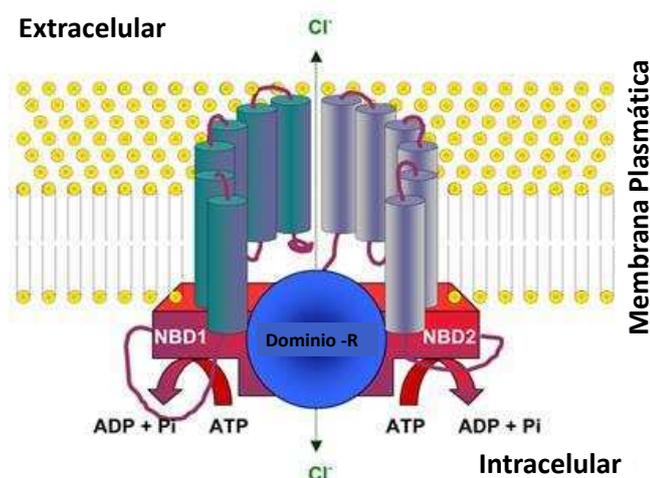


Figura 1.1. Modelo del CFTR. La proteína se compone de dos regiones transmembrana de 6tramos cada uno, conectados a un factor de unión nuclear que se une ATP (NBD). Entre estas dos unidades existe un dominio R que se compone de muchos aminoácidos cargados. El R-dominio es una característica única de CFTR dentro de la superfamilia ABC.

1.1. ASPECTOS CLÍNICOS DE LA FQ

La principal complicación a la que se enfrentan las personas que padecen FQ es el daño pulmonar crónico y progresivo, a pesar de que otros órganos y todas las glándulas de secreción exocrina se encuentran afectados en mayor o menor grado. Aproximadamente el 90% de los pacientes con FQ presentan insuficiencia pancreática exocrina (Zielenski 2000) y entre el 10 y el 20 % de los recién nacidos presentan íleo meconial, causado por un tapón espeso de mucus que obstruye el colon (Eggermont 1996).

1.1.1. Fisiopatología y manifestaciones clínicas de la enfermedad

El defecto o ausencia de la proteína CFTR lleva a la producción de secreciones alteradas de iones y de mucus, que generan la obstrucción del tracto respiratorio, los conductos pancreáticos, los conductos hepatobiliares, el lumen intestinal y los vasos deferentes (Leigh 1999), pero la morbilidad y la mortalidad están relacionadas principalmente con la enfermedad de las vías respiratorias (Gibson et al 2003).

La enfermedad no sigue el mismo patrón en todos los pacientes, sino que afecta a los portadores de las distintas mutaciones en grado y formas diferentes. Así, en la mayoría de los casos no existe una correlación significativa entre el tipo de mutación que afecta al CFTR (genotipo) y el grado de severidad de la enfermedad (fenotipo) (Collins 1992, Welsh & Smith 1993). Es por ello que todavía no es posible realizar una predicción fiable de la evolución clínica del paciente según el genotipo ya que existe una enorme variabilidad en la magnitud de la enfermedad pulmonar dentro de genotipos similares (Welsh & Smith 1995).

Hay numerosos factores que pueden modificar las manifestaciones clínicas, principalmente aquellos vinculados al daño pulmonar. Estos incluyen factores genéticos distintos al CFTR como los genes modificadores diferencias en el tratamiento clínico, influencia del medio ambiente y adquisición de infecciones, particularmente las originadas por virus y bacterias (Welsh et al 1995). Por otra parte, se presenta la dificultad de detectar clínicamente al paciente debido a que los heterocigotos para FQ no presentan síntomas clínicos fácilmente reconocibles (Noone & Knowles 2001), por lo que una sola copia del CFTR salvaje parecería ser suficiente para restaurar el transporte normal de cloruro.

La expectativa de vida de los pacientes con FQ está determinada en gran medida, por la progresión del daño pulmonar, que representa la causa de más del 90 % de los casos letales. En 2006, las personas con FQ tenían una edad media de supervivencia prevista de 37 años, lo que representa un aumento de 10 años más que en la década del '80. Este incremento en la supervivencia media es atribuible a los avances en el tratamiento de la enfermedad gastrointestinal y pulmonar (CFF 2011).

1.1.2. Infecciones e inflamación pulmonar

En la FQ, la actividad mucociliar es defectuosa y el mucus más viscoso que lo normal. Esta condición hace que las vías respiratorias sean incapaces de eliminar eficientemente las bacterias (Koch & Hoiby 1993). Está aún en discusión si el aumento de viscosidad del mucus se debe a una mayor acumulación de éste por la sobreproducción de mucinas (Gonzalez-Guerrico et al 2002), por una mayor deshidratación del mismo (Potter et al 1967), o a ambas causas. Algunos datos sugieren que debido a la escases de líquido presente en la superficie de las vías respiratorias en los pacientes con FQ trae como consecuencia una importante disminución en la actividad de sustancias antibacterianas endógenas, como por ejemplo β -defensinas y lisozimas (Figura 1.2.)(Goldman et al 1997).

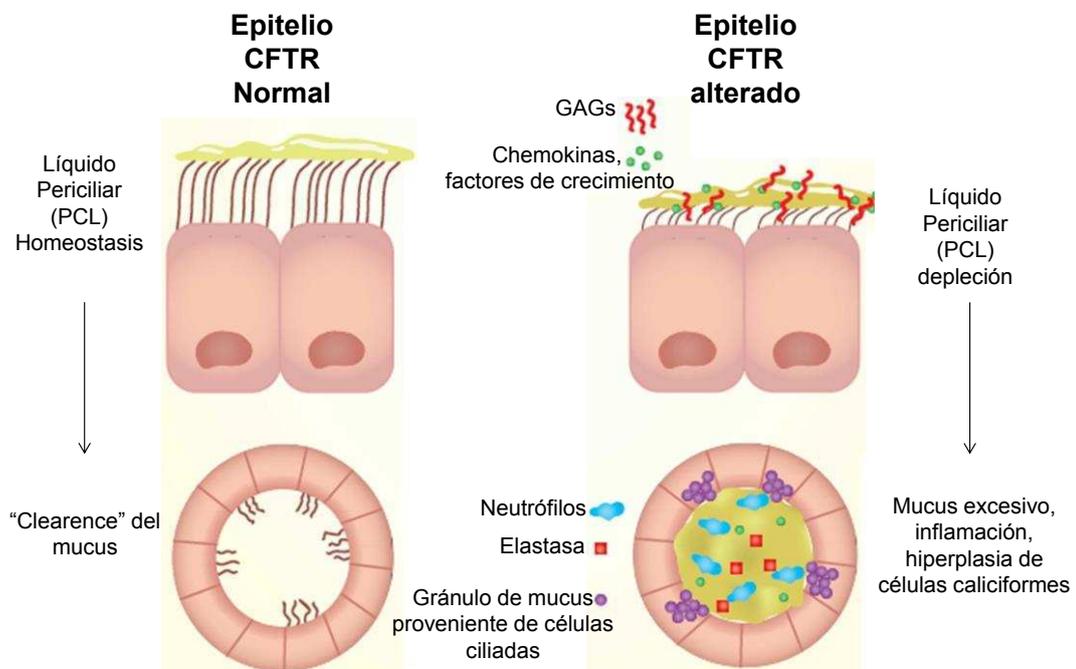


Figura 1.2. El saldo de la secreción de Cl^- a través de los canales de proteínas CFTR y la reabsorción de sodio a través de los canales de Na^+ epiteliales, mantiene el volumen normal de líquido de la superficie de las vías respiratorias, permitiendo a los cilios que recubren las vías respiratorias moverse libremente eliminando el moco de manera eficiente (Izquierda). En la vía respiratoria, la ausencia o disfunción de los canales de proteína CFTR interrumpe la secreción de NaCl y se absorbe debido a la pérdida de la regulación de proteínas CFTR. El efecto neto es la deshidratación del líquido superficial de las vías respiratorias, dando como resultado un moco pegajoso permitiendo a las bacterias permanecer retenidas allí. Esto da como resultado infecciones pulmonares crónicas, inflamación y deterioro de las funciones pulmonar de manera progresiva (Derecha). Imagen modificada obtenida de (Frizzell, 2004)

Durante el curso de la enfermedad pulmonar se desarrolla una obstrucción crónica, que se caracteriza por una progresión lenta que va desde la bronquiectasia (dilatación patológica de los bronquios o bronquiolos por acumulación de secreciones) hasta la muerte por paro cardiorrespiratorio. La complicación asociada al cuadro clínico, son las infecciones recurrentes con distintos patógenos, principalmente *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* siendo este último el más importante, pues su detección se asocia al deterioro pulmonar irreversible (Guggino 1999).

P. aeruginosa coloniza las vías respiratorias inferiores, primero intermitentemente y después de forma crónica, observándose con el transcurso del tiempo un cambio en el morfotipo de la misma. En infecciones tempranas predomina el morfotipo clásico, mientras que en las infecciones crónicas se encuentra un morfotipo denominado "mucoide", debido a la biosíntesis y secreción de grandes cantidades del polisacárido alginato por parte de estas cepas. Cabe destacar que todas las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ pueden producir alginato, aún las consideradas no mucoides. Esto sugiere que el microambiente del pulmón de un paciente con FQ presenta factores que estimulan la expresión del fenotipo mucoide (Gilligan 1991). Junto con el alginato, otros dos exopolisacáridos, el Psl y Pel, contribuyen en distintas etapas a la formación de una matriz conocida como *biofilm*, que otorga mayor resistencia a las bacterias frente a los anticuerpos y/o antibióticos, favoreciendo así la persistencia de la infección (Ghafoor, 2011). El mecanismo exacto de por qué falla el sistema inmune en la remoción de los microorganismos en la FQ no está claro, pero se cree que pueden ser por una falla generalizada de los mecanismos de defensa innata (Pier 2000) o de defensa adquirida (Krauss et al 1992, Moss et al 2000), a causa del transporte ineficiente de Cl⁻.

Se sabe que la infección bacteriana en el pulmón estimula la respuesta inflamatoria desencadenando un círculo vicioso. Por un lado *P. aeruginosa* comienza a producir poderosos quimioattractantes de neutrófilos, lo que permite su infiltración en el pulmón en forma persistente y por otra parte, los neutrófilos se autoactivan liberando más quimioattractantes, como leucotrieno B4 (LB4), que sostienen la infiltración neutrofílica. A su vez la secreción de IL-8 desde las células epiteliales está estimulada por la acción de la elastasa liberada por los neutrófilos. Este reclutamiento masivo de neutrófilos no es efectivo para eliminar las bacterias, sino que da origen a un daño considerable al pulmón (DiMango et al 1998, DiMango et al 1995, Kim et al 1989).

Según estudios realizados en muestras de fluido bronqueo-alveolar de niños asintomáticos, el aumento de IL-8 parece ser una característica temprana de la enfermedad en las vías aéreas (Armstrong, 1995; Cantin AM, 2006; Khan, 1995). Se observó que las células epiteliales son una importante fuente de IL-8 en FQ, observándose una regulación positiva para la expresión de esta citoquina durante la infección. Por otro lado, se halló que la expresión de IL-10, citoquina con característica anti-inflamatoria, se encuentra disminuida. También se ha encontrado aumentada la concentración de otras citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 e IL-6 en el fluido de lavados bronqueo-alveolares de las vías aéreas de pacientes con FQ (Bonfield et al 1995a, Bonfield et al 1995b).

1.2. TERAPIAS EXISTENTES PARA FQ

La FQ permanece incurable y los tratamientos empleados en la actualidad tienen como objetivo aliviar los síntomas o desacelerar el proceso de deterioro, a fin de mejorar la calidad de vida del paciente. Debido a que en FQ la principal causa de enfermedad y mortalidad se debe a la enfermedad pulmonar, los tratamientos están enfocados en reducir el daño en las vías respiratorias. Los distintos tipos de terapias se ajustan a las necesidades de cada paciente y combinan el uso de antibióticos y antiinflamatorios, en conjunto con diferentes estrategias para eliminar el mucus espeso de los pulmones.

1.2.1. Despeje de las vías respiratorias (“*Airway clearance*”)

Una vez establecida la infección e inflamación, aumenta la viscosidad en las vías aéreas debido a las altas concentraciones de ADN liberado por las células inflamatorias. Se suma a esto una mayor deshidratación de la capa de líquido luminal y el posible aumento en la secreción de mucus. Como consecuencia, se reduce el despeje de las vías aéreas, lo que permite que el ciclo de infección e inflamación continúe y conduzca al daño pulmonar (Davis 1999).

La finalidad de las técnicas de despeje de las vías respiratorias es ayudar a remover las secreciones aéreas viscosas, que contienen altas concentraciones de bacterias, elastasas, citoquinas y otros productos bacterianos. Existen varios métodos para llevar a cabo esta terapia; entre ellos se encuentran la fisioterapia de pecho tradicional, el ejercicio físico, el uso de aparatos mecánicos y técnicas de respiración y tos específicas (Segal 2004). Es importante que la terapia comience tan pronto como sea posible, ya que desde un comienzo muy temprano de la enfermedad se pueden encontrar mediadores inflamatorios y bacterias, por lo que la intervención para eliminar las secreciones bronqueo-alveolares es muy beneficioso (Khan et al 1995, Konstan et al 1994).

1.2.2. Terapia con antibióticos

El desarrollo de antibióticos potentes de amplio espectro, en particular los dirigidos contra *Pseudomonas*, han permitido aumentar la supervivencia de los pacientes con FQ desde hace varias décadas (Pedersen et al 1987). La finalidad del uso racional de antibióticos en FQ es reducir la infección bacteriana crónica que induce la inflamación de las vías aéreas, la obstrucción de las mismas y la bronquiectasia. La infección con *P. aeruginosa* no puede ser completamente erradicada a pesar de una terapia agresiva con antibióticos, pero sí puede ser reducida (en conjunto con otras terapias como el despeje de las vías respiratorias), observándose una mejora en los síntomas y en la función pulmonar (Smith et al 1988). Los antibióticos pueden ser administrados en forma intravenosa, oral o aerosolizados, lo que depende de la situación clínica de cada paciente en particular.

Para realizar una terapia exitosa con antibióticos administrados por vía intravenosa, es fundamental usar la combinación y la dosis apropiada de drogas durante un tiempo adecuado. También es muy importante identificar las bacterias presentes en el esputo del paciente para guiar la elección de los antibióticos. La terapia intravenosa es generalmente aplicada a las exacerbaciones severas de la enfermedad. La terapia oral en cambio, se encuentra más limitada a las exacerbaciones de severidad moderada. Los antibióticos de amplio espectro pueden proveer beneficios clínicos aun cuando no sean activos contra las especies de *Pseudomonas*, ya que son efectivos contra otras bacterias presentes en el tracto respiratorio inferior (Jewes & Spencer 1990). El uso de antibióticos administrados por inhalación presenta la ventaja de aportar una mayor concentración de la droga en los pulmones (Littlewood et al 1993, Toso et al 1996).

1.2.3. Tratamiento con DNasa

Debido a que la presencia de altas concentraciones de ADN en las secreciones de las vías aéreas que aumentan la viscosidad del mucus, su ruptura mediante el tratamiento con desoxirribonucleasa recombinante humana (DNasa rh) favorece su eliminación de las vías aéreas. La DNasa rh ha sido probada en análisis clínicos y aprobada por la "U.S. Food and Drug Administration" (Shak 1995). Los estudios *in vitro* junto con los estudios clínicos demostraron que la DNasa reduce las propiedades viscoelásticas del esputo en FQ (Aitken et al 1992, Hubbard et al 1992, Ramsey et al 1993).

1.2.4. Terapia anti-inflamatoria

El tratamiento de la inflamación es fundamental para el manejo de la enfermedad pulmonar en FQ, particularmente por la evidencia de inflamación en la vida temprana de los pacientes. El uso sistémico de corticosteroides para este propósito está limitado por la alta incidencia de efectos laterales (Rosenstein & Eigen, 1991). Por otra parte, el ibuprofeno es el antiinflamatorio no esteroideo más utilizado en FQ por su capacidad de inhibir la migración de los neutrófilos (Konstan, 1998), aunque también posee algunos efectos secundarios. En la actualidad, se buscan alternativas anti-inflamatorias de menor toxicidad.

1.3. *P. aeruginosa*: su implicancia como organismo patógeno oportunista

1.3.1. Generalidades

P. aeruginosa es una bacteria aerobia Gram-negativa perteneciente a la rama γ de las proteobacterias, misma rama a la que pertenecen las enterobacterias (Figura 1.3.) (Pace 1997, Woese 1987). *P. aeruginosa* tiene una longitud de 1.5 a 3 μm y un diámetro de 0.5-0.8 μm , posee un genoma extenso de 6.26 Mbp (codificando 5567 genes) cuya secuencia fue

publicada en agosto del año 2000(www.pseudomonas.com) (Stover et al 2000) para el aislado clínico PAO1. Sin embargo, los aislados provenientes de pacientes con FQ, tienen un genoma más extenso que la cepa PAO1, sugiriendo que adquieren nuevos genes durante su adaptación (Spencer et al 2003).

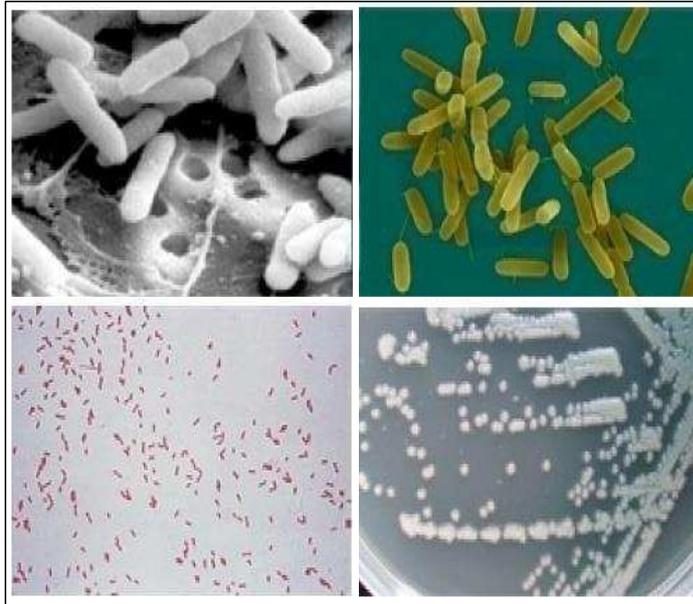


Figura 1.3. *Pseudomonas aeruginosa* vista en distintos aumentos.: Microscopía electrónica, microscopía óptica, colonias crecidas sobre una placa de agar, tinción Gram de bacterias.

Fotografías tomadas de http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomonas_aeruginosa_SEM.jpg; <http://www.pseudomonas.com/images/paeruginosa.jpg>; <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>; http://news.bbc.co.uk/olmedia/1745000/images/_1746739_pseudomonas_aeruginosa300.jpg

Una de las características más notables de *P. aeruginosa* es su versatilidad para colonizar diversos nichos ecológicos, desde el agua y el suelo, como en tejidos de plantas y animales (D'Argenio 2001 , Rahme et al 1997). Esta capacidad se debe, a que puede utilizar una innumerable gama de compuestos orgánicos para su supervivencia y permanecer largos períodos de tiempo en condiciones extremas dónde la disponibilidad de nutrientes es escasa.

La importancia de *P. aeruginosa* como patógeno oportunista para los seres humanos, radica en la dificultad de controlarlo mediante el uso de antibióticos y antisépticos convencionales (Bergen & Shelhamer 1996,). Muchas infecciones (Figura 1.4.) extrahospitalarias e intrahospitalarias son causadas por esta bacteria y genera elevados costos en la salud pública (Bauer et al 1996). Los mecanismos de resistencia intrínseca que posee *Pseudomonas*, se debe en parte al bloqueo del ingreso del antibiótico o antiséptico, a la salida activa de estos desde la célula, su degradación enzimática o la alteración de la estructura blanco. Además, la patogénesis de *P. aeruginosa* se atribuye a la producción un vasto arsenal

de factores de virulencia (de membrana y extracelulares) involucrados en las diferentes etapas de proceso de infección logrando la colonización de su hospedador. En las infecciones agudas, predomina la invasión, la diseminación y el extenso daño tisular. Sin embargo, en infecciones crónicas, especialmente en pacientes con fibrosis quística, *P. aeruginosa* se puede adaptar, perdiendo sus características inmunogénicas como fimbrias y flagelos para evitar la supresión inmunológica por parte de las defensas del hospedador logrando adherirse al epitelio respiratorio en forma de “*biofilms*”. En las infecciones crónicas, la inflamación se mantiene por la secreción persistente de factores virulencia extracelulares (Khalifa et al 2011).

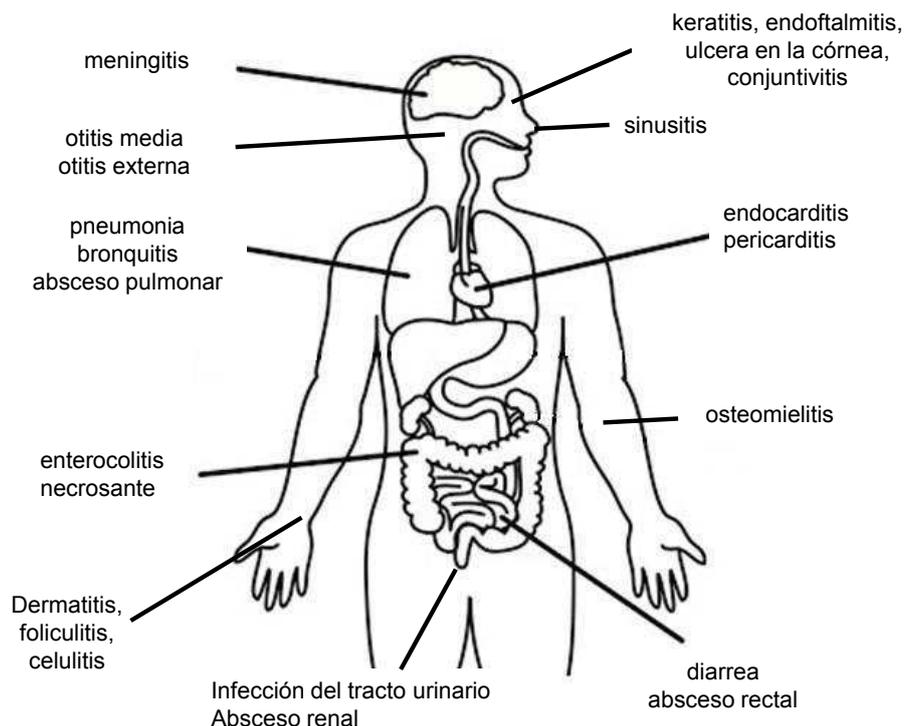


Figura 1.4. Sitios de infección de *P. aeruginosa*

1.3.2. Factores de virulencia implicados en la infección aguda

El proceso hacia la enfermedad para un patógeno oportunista como *P. aeruginosa*, comienza con alguna elusión o alteración de las defensas del hospedador debido al amplio espectro de factores de virulencia que despliega la bacteria para establecer la infección (Figura 3.3.). La mayoría de las infecciones causadas por la bacteria involucra tres etapas distintas: (1) adherencia a las superficies epiteliales del hospedador y colonización; (2) invasión (3) desarrollo de enfermedad sistémica. Sin embargo, el proceso de infección puede detenerse en cualquier etapa debido a que cada una de ellas está mediada por determinantes bacterianos de virulencia.

1.3.3. Factores implicados en la adherencia y motilidad

• El flagelo

P. aeruginosa posee un único flagelo polar que está involucrado en la adhesión células epiteliales respiratorias a través de un componente de la membrana celular eucariota, el asialo-GM1 (Arora et al 1998, Feldman et al 1998, Lillehoj et al 2002). A su vez, induce la respuesta inflamatoria por la interacción con receptores Toll, TR5 y TR2, produciendo la liberación de IL-8 e IL-6. El flagelo es altamente inmunogénico, especialmente durante las infecciones crónicas y particularmente en la fibrosis quística, donde se adapta seleccionando mutantes que carecen de flagelos para eludir la respuesta inmunológica de su hospedador (Mahenthiralingam et al 1994). Además es el responsable del movimiento bacteriano sobre superficies líquidas conocido como “*swimming*” (nado) y en menor medida sobre superficies semi-sólidas conocido como “*swarming*” en donde el desplazamiento se da por el movimiento en conjunto y concertado de las bacterias (O'Toole & Kolter 1998).

• El pilus tipo IV

El pilus tipo IV es la principal adhesina de *P. aeruginosa* responsable de la adhesión a las células epiteliales (Sato et al 1988, Vitkauskienė et al 2005;Vallet et al 2001). Estas estructuras interactúan in vitro con asialo-GM1 y asialo-GM2, situados en la superficie de las células epiteliales del pulmón (de Bentzmann et al 1996, Hahn 1997, Ramphal et al 1984). También está implicado en la motilidad sobre superficies sólidas movimiento conocido como “*twitching*” y en el “*swarming*” (O'Toole & Kolter 1998).

• Factores de unión de tipo fimbria (o Cap).

P. aeruginosa posee también unas estructuras filamentosas y proteicas más cortas que los pili llamados fimbrias. Estas estructuras están cubiertas por unas proteínas llamadas CapA, CapB y CapC, siendo esenciales para la adherencia a las superficies y necesarias para la colonización.

• El Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) está situado en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas y es conocido por su actividad endotóxica. Está involucrada en la estimulación de la respuesta inflamatoria. La molécula de LPS se puede dividir en tres partes:

- Lípido A, también conocido como endotoxina, responsable de una estimulación excesiva del sistema inmune que puede causar shock séptico y llevar a la muerte;
- El núcleo oligosacárido;
- El antígeno O es una región de polisacáridos variable. *P. aeruginosa* es capaz de sintetizar dos formas de LPS A y B. De acuerdo al antígeno O, si está presente o falta, se habla de fenotipo liso o rugoso y esta diferencia hace que una bacteria sea más o menos virulenta.

1.3.4. Factores implicados en la colonización dependientes del “*Quorum sensing*”

La capacidad de *P. aeruginosa* en invadir los tejidos depende de la producción de enzimas extracelulares y toxinas que rompen las barreras físicas y dañan a las células del hospedador, resistiendo a la fagocitosis y a las defensas inmunitarias del huésped (Hong & Ghebrehiwet 1992; Ciragil & Soyletir 2004, Khan et al 2006). *P. aeruginosa* posee numerosos factores involucrados en la infección y la expresión de ellos se encuentra regulada por un complejo mecanismo de sensado conocido como “*quorum sensing*” (QS). Algunos de estos factores responsables del establecimiento se mencionan a continuación.

• Elastasa

La actividad de elastasa está mediada por dos enzimas: LasA y LasB. La elastasa LasA (también llamada proteasa de estafilococos o antiestafilolisina) es una proteasa de serina que actúa sinérgicamente con LasB aumentando el poder degradativo de ella. LasB (también llamada pseudolisina) es una metaloproteasa de zinc con actividad proteolítica. Esta enzima se halló en el esputo de los pacientes con FQ (Jaffar-Bandjee et al 1995, Storey et al 1992) y se sabe que actúa sobre la elastina, es capaz de inactivar inmunoglobulinas como IgA e IgG, los componentes del complemento (Heck et al 1986; VanDelden 2004) y los de la matriz del epitelio pulmonar como elastina, colágeno y fibrina (Galloway 1991; Ciragil & Soyletir 2004, Karadzic et al 2004). LasB también degrada citoquinas como el interferón gama (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF).

• Fosfolipasa C

Las fosfolipasas son enzimas extracelulares termolábiles de alrededor de 80 kDa que contienen iones esenciales para la actividad enzimática de zinc. Tres fosfolipasas C (PLC) de diferente especificidad de sustrato se fueron identificadas en *P. aeruginosa*. Estas contribuyen a aumentar la permeabilidad vascular, en diversos tejidos y se observó toxicidad y muerte en animales de laboratorio (Berk et al 1987; Jaffar-Bandjee et al 1995, Kohler 2000).

• Ramnolípidos

Otro factor de virulencia ampliamente estudiado es un biosurfactante glicolípido que contiene ramnosa, llamado comúnmente “ramnolípido”. Este tiene una estructura molecular parecida a los detergentes y se cree que es el responsable de romper los surfactantes fosfolípidicos del pulmón, y de esta manera hacerlos más accesible al clivaje por fosfolipasas C de *P. aeruginosa* (Liu 1974). Se cree que, tanto la fosfolipasa C y el ramnolípido, actúan sinérgicamente para romper lípidos y lectinas facilitando la invasión tisular (VanDelden 2004). Por su composición, los ramnolípidos poseen propiedades tensio-activas capaces de reducir la tensión superficial, formar emulsiones y solubilizar sustratos insolubles, para que *P. aeruginosa* los emplee en la captura de diversas fuentes de carbono tales como alcanos (Beal

2000; Goma 1973). En el esputo de los pacientes con FQ, se hallaron ramnolípidos y se encontró que en células de la tráquea de mamíferos inactivan el movimiento ciliar, indicando que los ramnolípidos son factores de virulencia (Hastie 1986, Kownatzki 1987). La producción de ramnolípidos coincide con la fase estacionaria de crecimiento y está bajo el control del sistema *rhl* del sistema de sensado del quórum bacteriano o *quorum sensing* (Campos-García et al 1998; Ochsner et al 1994, Ochsner & Reiser 1995). Se sabe además que en *P. aeruginosa* los ramnolípidos están ligados al movimiento de *swarming*, dado a que la secreción de biosurfactantes reduce la fricción entre la bacteria y las superficies facilitando su desplazamiento (Kohler et al 2000).

- **Piocianina y pioverdina**

Estos factores de virulencia liberados al medio extracelular juegan un rol central en la patogénesis bacteriana. El primero, la piocianina es un pigmento verde-azulado que lo libera al medio extracelular llamado piocianina. Este pigmento, posee propiedades redox, y debido a ello genera especies reactivas del oxígeno exponiendo a las células del hospedador al estrés oxidativo (Britigan et al 1999, Muller 2002). Esto altera la función mucociliar, también induce apoptosis e inhibe la generación de anión superóxido por los neutrófilos impidiendo la proliferación de linfocitos en el sitio de la infección (Usher et al 2002). El segundo es un sideróforo, que juega un rol en la quelación de hierro y en la regulación de los factores de virulencia. Se cree que ambos son necesarios para una completa expresión de la patogenicidad de *P. aeruginosa* tal como se observó en animales de experimentación (Lamont et al 2002, Takase et al 2000).

1.3.5. Factores implicados en la colonización independientes del “*Quorum sensing*”

- **Sistema de secreción tipo III**

P. aeruginosa posee un sistema de secreción (llamado tipo III) que le permite inyectar toxinas directamente dentro de la célula. Varias toxinas son secretadas a través de este sistema: ExoS, ExoT del ExoU y ExoY. De todas, la ExoS es la citotoxina mejor caracterizada. Este efector se transloca principalmente en el citoplasma de la célula eucariota objetivo, pero también se secreta en el medio extracelular y se vio que inhibe la movilidad y la fagocitosis. ExoS, es producida por alrededor del 40% de los aislados clínicos (Sokurenko et al 2001), y se ha postulado que es responsable de la destrucción tisular y la diseminación bacteriana (Nicas et al 1985 a, Nicas & Iglewski 1985; Shaver & Hauser 2004, Zhang & Barbieri 2005) debido a que desorganiza los filamentos de actina de las células eucariotas (Coburn J 1989). El rol de ExoY en la patogénesis de *P. aeruginosa* aún no es claro, mientras que la ExoU está expresada en muchos aislados provenientes de infecciones en la córnea, en 40% de los aislados de las infecciones agudas del tracto respiratorio en individuos no-FQ y 10% en aislados FQ (Finck-Barbancon et al 1998; Hauser et al 1998; Dacheux et al 2000).

La secreción de la ExoU es claramente citotóxica para células de mamíferos y las investigaciones sugieren que puede tener actividad fosfolipasa (Rabin SDP 2003), contribuyendo a la degradación de membranas celulares de eucariotas y subsecuentemente a la muerte celular (Sato et al 1988). Por otra parte, la exotoxina A (Guadarrama et al 2005, Shaver & Hauser 2004, Takumida & Anniko 2006) inhibe el factor 2 de elongación eucarionte, con la interrupción en la síntesis proteica y la contribución a la muerte de las células del hospedador (Wick et al 1990). La exotoxina A purificada, es letal para animales de laboratorio, confirmando su rol como factor de virulencia de *P. aeruginosa* (Woods & Iglewski 1983).

1.3.6. Factores de *P. aeruginosa* de virulencia implicados en la infección crónica

Una vez que la bacteria ha logrado invadir al huésped deberá sobrevivir al ataque de la defensa innata y la adquirida, como también a los repetidos tratamientos con antibiótico tópico y/o sistémico. Para tener éxito, *P. aeruginosa* desarrollará una amplia gama de estrategias inmuno-evasiva incluyendo la expresión de otras proteínas extracelulares, además de las mencionadas, como de proteasas, lipasas, etc. La secreción de estos productos extracelulares estará acompañado por cambios fenotípicamente significativos QS-dependiente, como la formación de “*biofilms*”. La presencia del “*biofilm*” en el hospedador como también en los dispositivos médicos, obstaculiza la acción de linfocitos, fagocitos, la acción de los cilios de las vías respiratorias, anticuerpos, complemento, antibióticos y antisépticos (Govan & Deretic 1996). Esta diferenciación de microorganismo planctónico a microorganismo dentro del “*biofilm*”, se lo considera como la principal característica de las infecciones originadas por *P. aeruginosa* (Watnik 2000).

1.3.7. El *biofilm* como factor de resistencia de *P. aeruginosa*

La resistencia a los antibióticos por los microorganismos, el incremento de infecciones recurrentes e intrahospitalarias por contaminación de dispositivos médicos, así como la dificultad para la cicatrización de heridas son algunos de los problemas cotidianos en la práctica médica. En la actualidad se sabe que el origen de estos hechos se debe a la capacidad de los microorganismo en desarrollar *biofilms* como mecanismo de supervivencia (Rivera 2010).

Clásicamente se define al *biofilm* como una comunidad de microorganismos homogéneos o heterogéneos, que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos adherido a una superficie inerte o un tejido vivo (Costerton et al 1995).

En *P. aeruginosa* la matriz de polisacáridos está dada por la producción de Pel, Psl y alginato, este último es uno de los componentes mayoritarios, también contiene ADN extracelular producto de la autólisis de la bacteria o de células del hospedador y proteínas. Esta estructura formada por la bacteria retrasa la difusión de antibióticos a través del *biofilm* e

impide el acceso del sistema de defensa del hospedador (Greenberg 2003). Estudios realizados utilizando microscopia confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del *biofilm* no es totalmente compacta sino que presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del *biofilm* (figura 1.5.A).

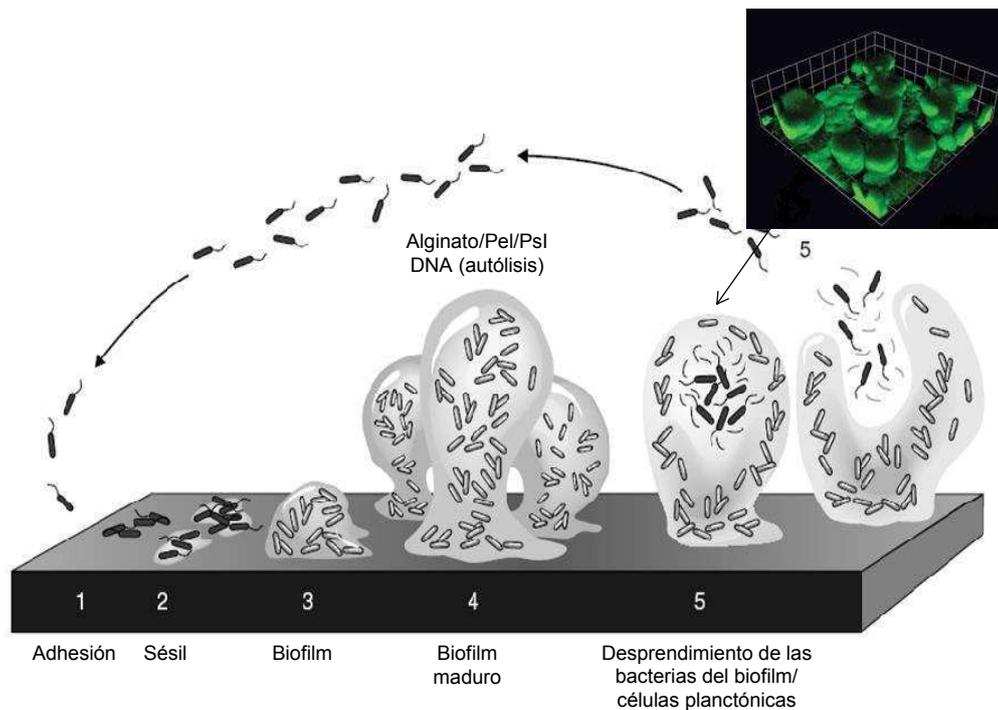


Figura 1.5. Biofilm de *P. aeruginosa* mostrando la estructura tipo seta (o mushroom). Imagen tomada de Harvard Laboratory *biofilm*. <https://depts.washington.edu/cshlab/index.html> (A) Estadios del desarrollo del biofilm: (1) adherencia reversible al sustrato, (2) adhesión irreversible al sustrato, formación de microcolonias (3) maduración y crecimiento de la microcolonia (4) maduración *biofilm* (5) dispersión. (B) Fotomicrografías del desarrollo del *biofilm* de *P. aeruginosa*. Imagen tomada de Sauer 2003 (Sauer 2003).

La etapa inicial del proceso de formación del *biofilm* es la adherencia sobre la superficie. En *P. aeruginosa*, se ha visto que el flagelo y las fimbrias son importantes para la etapa de adherencia primaria. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar. En una etapa posterior la bacteria comienza a liberar exopolisacáridos y forma unas estructuras similares a setas (*mushrooms*) entre las cuales se observa la presencia de canales de agua. A su vez dentro del *biofilm* se genera un gradiente de oxígeno y nutrientes que induce la formación de subpoblaciones bacterianas distintas que varían en su susceptibilidad a los antibióticos; por ejemplo la exposición a β -lactámicos o colistina puede inducir la producción de

factores de resistencia como las bombas de eflujo AmpC β -lactamasa y MexA-MexB-OprM. Al mismo tiempo, la liberación de ramnolípidos por las bacterias en la superficie induce necrosis de los neutrófilos. Finalmente, algunas bacterias de la matriz del *biofilm* se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de formación del *biofilm* (Figura 1.5..B)(Mah & O'Toole 2001;Greenberg 2003).

Tanto el “*biofilm*” como los factores de virulencia descritos anteriormente junto con otros mencionados en la literatura, contribuyen al deterioro de la mucosa bronquial la depuración mucociliar y la función pulmonar en los enfermos de FQ infectados con *P. aeruginosa*.

Hoy en día se sabe que la mayoría de los factores de virulencia y el *biofilm* están regulados por un complejo mecanismo conocido como “*quorum sensing*”, y dado a su rol en el control de la producción de factores de virulencia extracelular, el circuito de *quorum sensing* de *P. aeruginosa* podría ser considerado un determinante de virulencia de la bacteria (d'Argenio 2004, Gilboa-Garber 1996, Mai et al 1993, VanDelden 2004).

1.4. QUORUM SENSING: El poder de la cooperación en el mundo de *P. aeruginosa*

1.4.1. Breve reseña

Durante muchos años, los investigadores consideraban a las bacterias como una unidad individual con la capacidad de proliferar bajo ciertas condiciones y que eran incapaces de interactuar con otras, respondiendo colectivamente frente a un estímulo ambiental, como lo hace típicamente un organismo multicelular. Este punto de vista comenzó a cambiar a partir de la década del '70, con el descubrimiento de la regulación de la luminiscencia, en la bacteria marina Gram-negativa *Vibrio fischeri*(Nealson et al 1970) y de la regulación de la competencia en la bacteria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*(Tomasz 1965). Los investigadores observaron que estas bacterias, interactuaban de forma cooperativa y de manera coordinada cuando producían unas moléculas “señalizadoras” o “señales” específicas.

En la actualidad, se sabe que estas moléculas de señalización se acumulan conforme aumenta la población bacteriana y a medida que alcanzan una concentración crítica, son reconocidas o sensadas por la misma población de bacterias (y otras), disparando la expresión de genes blancos a fin de dar una respuesta en conjunto (Fuqua et al 1994). A este tipo de comunicación célula-célula, se la denominó sensado del *quórum quorum sensing* (QS), para enfatizar el hecho de que se requiere de un número suficiente de bacterias, “*quórum*”, que produzcan y sensen las moléculas señalizadoras, e induzcan o repriman la expresión de genes blancos (Fuqua et al 1994).

Las moléculas de señalización para el sistema del QS son frecuentemente homoserin lactonas aciladas (AHL, del inglés acylated homoserine lactones) para el caso de bacterias

Gram-negativas, y péptidos pequeños o autoinductor-2 (AI2) en el caso de bacterias Gram-positivas. Dado que este sistema se lo encontró tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, se lo considera un “lenguaje universal bacteriano” (Winans 2002).

A partir del descubrimiento de la regulación de la bioluminiscencia dependiente de la densidad de población, en *V. fischeri*, se incrementó el número de publicaciones donde se demuestra que las bacterias emplean las moléculas señal no sólo como sensores de la densidad de población en una especie, sino también para la comunicación entre bacterias de especies diferentes o género, que ocupen el mismo nicho ecológico, y también para interactuar con las células eucariotas del hospedador (Kipnis et al 2006).

La comunicación célula-célula y la formación de estas comunidades bien organizadas, permite unificar y coordinar la respuesta frente a un determinado estímulo ambiental y resolver situaciones que podrían resultar difíciles para la supervivencia de una única bacteria.

Además de la bioluminiscencia y la competencia genética, el QS está involucrado en la regulación de una amplia variedad de procesos fisiológicos diferentes que incluye: biosíntesis de antibióticos, motilidad, transferencia de plásmidos mediante conjugación, desarrollo de *biofilms* y producción de diversos factores de virulencia (Camara et al 2002, Fuqua & Greenberg 2002, Lazdunski et al 2004, Miller & Bassler 2001, Whitehead et al 2001).

1.4.2. El sistema de comunicación célula-célula en *P. aeruginosa*

El sistema de comunicación célula-célula dependiente de AHL más estudiado es el del *P. aeruginosa* y presenta un circuito de QS esencial para la expresión de los factores de virulencia como también para el desarrollo del *biofilm*. Está ampliamente aceptada la idea que, la regulación de la patogenicidad por el sistema de QS, es una estrategia altamente efectiva que emplea *P. aeruginosa* para establecer la infección. Esto le permitiría tener tiempo suficiente para crecer y colonizar, evitando la respuesta del sistema inmune del hospedador, minimizando la amenaza de la erradicación y logrando de este modo una colonización exitosa (de Kievit & Iglewski 2000, Greenberg 2003).

Cuando se investigó la regulación del QS en *P. aeruginosa*, se encontró dos pares de homólogos a LuxR y LuxI de *Vibrio Fischeri* (Nealson et al 1970), los cuales son los principales componentes de dos sistemas de sensado que operan en este organismo. El primero el sistema *las*, consiste en un activador transcripcional LasR; y en una sintasa LasI, que dirige la síntesis de N-3-oxo-dodecanoyl-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL); y el segundo sistema *rhl*, que consiste en el regulador transcripcional RhIR y la sintasa RhII (Figura 1.6.), y dirige la síntesis de N-butanoyl-homoserina lactona (4-HSL) (Passador et al 1993). *P. aeruginosa* es permeable a C4-HSL, mientras que la bomba de eflujo de drogas MexAB-OprM libera por transporte activo la molécula 3-oxo-C12-HSL (Pearson et al 1999).

siendo el sistema *las* el punto inicial de la cascada. Sin embargo, Dekimpe V. y Deziel E. en 2009 (Dekimpe & Deziel 2009), propusieron que el sistema *rhl* puede activarse de forma independiente del sistema *las* por lo que *P. aeruginosa* sería capaz de eludir la deficiencia de uno de los sistemas de QS. Esta evidencia demuestra que la jerarquía dentro del sistema de QS es más compleja que el modelo presentado y aceptado para el sistema jerárquico *las-rhl*. *P. aeruginosa* también produce una tercera molécula de señalización, 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona denominada PQS, que a diferencia de las otras no es una homoserin lactona. Se sabe que cumple la función de aumentar la expresión de un número de factores de virulencia y por lo tanto, PQS junto con 3-OC12-HSL, C4-HSL, constituyen una red de señalización complejo que controla la expresión de más de 300 genes (Mashburn-Warren, 2009).

1.4.3. Rol del *quorum sensing* en la interacción hospedador-patógeno

Como se mencionó, el QS modula la expresión de los factores de patogenicidad, (Hassett et al 1999, Latifi et al 1996, Latifi et al 1995, Passador et al 1993, Pearson et al 1997), y a su vez el evento de desprendimiento activo de bacterias migrando desde el *biofilm* (Stoodley et al 2001).

Un estudio llevado a cabo por Davis et al, (Davies et al 1998) demostró que la mutante en *lasI* de *P. aeruginosa* crecía normalmente pero formaba *biofilms* desorganizados no diferenciados contrariamente a lo que ocurría en la cepa silvestre y exhibía mayor sensibilidad a biocidas, como el dodecil-sulfato sódico(SDS). Sobre la base de esta observación se ha sugerido que el sistema *las* es requerido para el desarrollo de la arquitectura típica del *biofilm* (figura 1.4). Los últimos estudios sobre QS, mostraron que ambos sistemas tanto *las* y *rhl* están implicados bajo ciertas condiciones experimentales, en el desarrollo de la estructura del *biofilm* de *P. aeruginosa* y las alteraciones sobre estos sistemas dan como resultado un *biofilm* desorganizado, dado a que se requieren ciertos factores regulados por estos sistemas para su maduración (Hentzer 2004).

Se ha observado que mutantes de la bacteria en el QS, comprometidas en la capacidad de establecer una infección en ratones, resultaron menos patogénicas que su cepa parental cuando se inoculaban sobre lesiones cutáneas como quemaduras, o en modelos murinos neonatales con neumonía (Rumbaugh et al 1999, Tang et al 1996). También, las mutantes en QS han mostrado ser menos virulentas en otros modelos de infección, como *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum* y *Arabidopsis thaliana*(Cosson et al 2002, Rahme et al 1995, Tan et al 1999) concluyendo que el QS de *P. aeruginosa* contribuye no sólo a la patogénesis por la expresión de los factores de virulencia, sino también induce inflamación. Esta observación fue confirmada cuando se aplicaron inyecciones dérmicas de AHIs en ratones, y se observó que estimulaban la producción de citoquinas proinflamatorias y ácido araquidónico (Smith et al 2002). Se estableció que la molécula 3-oxo-C12-HSL posee la capacidad de ejercer numerosas actividades inmunomoduladoras sobre los linfocitos, los macrófagos y la producción de anticuerpos, influye en el balance de las células Th1 y Th2

(Telford et al 1998), y promueve fuertemente la producción de interleuquina 8 (IL-8) (Smith et al 2001). Sin embargo, si el hospedador es infectado por *P. aeruginosa*, la defensa innata es capaz de inactivar las moléculas de *quorum sensing*, como ocurre con el epitelio celular y los fluidos corporales que inactivan la 3-oxo-C12-HSL pero no la C4-HSL (Chun et al 2004).

1.4.4. *Quorum sensing* como blanco en una terapia antimicrobiana

Existe una gran cantidad de cepas bacterianas emergentes, las cuales son parcial o completamente resistentes contra un amplio espectro de antibióticos. El rápido incremento en la frecuencia de aparición de cepas resistentes a la extensa variedad de drogas, crea la necesidad de buscar nuevas aproximaciones terapéuticas. Dado a que el QS en *P. aeruginosa* juega un rol importante en el control de la patogenicidad como también en la formación de *biofilms*, representa un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Davies et al 1998, Hartman & Wise 1998, Passador et al 1993). Se ha sugerido que el uso de antagonistas de AHLs que inhiban específicamente la expresión de los factores de patogenicidad, sin afectar el crecimiento de la bacteria, tienen la ventaja de minimizar la posibilidad de la selección de mutantes resistentes.

En la actualidad se ha hipotetizado que la disrupción del *quorum sensing* podría llevarse a cabo por varios caminos: (i) bloquear la síntesis de AHL, (ii) degradar la molécula señal AHL, o bien (iii) inhibir la activación del receptor de AHL. Bajo esta hipótesis, varios trabajos demostraron que análogos a la S-adenosil metionina, puede inhibir el *quorum sensing* en *P. aeruginosa* dado a que bloquea la síntesis de AHL (Parsek et al 1999). En el 2001 se aisló una enzima, la AiiA, de *Bacillus sp*, que inactiva las AHLs mediante la hidrólisis de las uniones de las lactonas, proceso denominado como *quorum quenching* (Dong et al 2001). De ahí en adelante se han identificado numerosos genes de varios organismos que inactivan las AHL. Más aún, se observó que la expresión heteróloga de estas enzimas en *P. aeruginosa* reduce la producción de los factores de virulencia atenuando la patogenicidad de este organismo (Reimann et al 2002). Sin embargo, aún no se determinó si AiiA o enzimas relacionadas, podrían aplicarse al tratamiento de las infecciones humanas.

Una estrategia para la disrupción del *quorum sensing* sería bloquear la proteína receptora de AHL. Esta idea surgió en 1996, donde Givskov y col. (Givskov et al 1996) demostraron que las furanonas halogenadas producidas por la macroalga *Delisea pulchra* tenían la habilidad de interferir con los procesos que regulan a las AHLs. Mientras que el modo exacto de acción de las furanonas no ha sido identificado aún, se sabe que estos compuestos bloquean la comunicación célula-célula de *P. aeruginosa* por tiempos prolongados y también origina la disgregación del *biofilm* (Hentzer & Givskov 2003). Hasta el momento unas pocas plantas han demostrado actividad anti-*quorum sensing* contra *P. aeruginosa* (Adonizio et al 2006) pero el mecanismo de acción sigue siendo desconocido (Priya et al 2013).

1.5. SUSTANCIAS PROCEDENTES DE PLANTAS CON ACCIÓN ANTIMICROBIANA Y ANTINFLAMATORIA.

Las plantas viven en un entorno con una densidad bacteriana muy alta. Se estima que en la parte aérea de las plantas, la filosfera, especialmente en las hojas, existen alrededor de 10^6 - 10^7 células/cm² (10^8 células/g) de microorganismos, principalmente bacterias (Andrews & Harris 2000). Gran parte de ellos forman parte de la ecología vegetal, estableciéndose un equilibrio que puede fragmentarse por diversos motivos, como ser la colonización de un organismo patógeno. Las plantas producen miles de productos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios que se diferencian de los primarios en que no son esenciales para la vida de la planta. Esta diversidad tan rica resulta, en parte, de un proceso evolutivo conducido por la selección para adquirir una defensa mejorada frente a los ataques de microorganismos, insectos y otros animales (Dixon 2001).

Las investigaciones previas sobre el potencial antibacteriano de una planta o sus biocompuestos, se basaba estrictamente en si tenía la capacidad de matar o inhibir el crecimiento bacteriano (Cowan 1999, Wallace 2004). Sin embargo, esto es sólo un aspecto de las propiedades anti-infectivas de las plantas. Las propiedades anti-patogénicas de las plantas no recibieron demasiada atención hasta hace algunas décadas con el conocimiento del QS bacteriano. No obstante, el hallazgo de compuestos capaces de interferir con ese sistema puede resultar tan importante en la erradicación de la enfermedad, como aquel con propiedades antibacterianas, y así colaborar para que la bacteria sea menos virulenta (Zhang & Dong 2004). Por lo tanto, la aplicación de compuestos provenientes de fuentes naturales con características inhibitorias del crecimiento o de la virulencia bacteriana, pueden ser utilizados en el tratamiento de las infecciones en humanos (Hentzer & Givskov 2003). Es posible que muchas plantas terrestres puedan producir señales capaces de interferir con el QS bacteriano (Gao et al 2003). Un estudio realizado con plantas medicinales provenientes del Sur de la Florida, EE.UU, identificó inhibidores del QS a partir de una variedad de 50 plantas, cuando se empleaban cepas biosensoras de las moléculas señal del QS como *Chromobacterium violaceum* 026 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (Adonizio et al 2006). De todas las plantas evaluadas, 6 presentaban actividad anti-QS.

No sólo las plantas utilizadas en la medicina tradicional son atractivas para el hallazgo de nuevos compuestos con actividad anti-bacteriana o anti-*quorum sensing*. Además de las plantas medicinales, plantas que son comúnmente consumidas en la dieta diaria, son una fuente interesante de fitoquímicos que pueden ofrecer un atractivo repertorio para el hallazgo de inhibidores de QS. El potencial de estos fitoquímicos en el manejo de las enfermedades infecciosas ha atraído particular atención (Dahiya & Purkayastha 2012), debido a la capacidad de estos en afectar el crecimiento y la supervivencia de muchos patógenos humanos, y también en reducir los procesos inflamatorios que la infecciones desencadenan (Surh et al 2001).

Los compuestos naturales han dado lugar a un gran interés científico en el área de la farmacológica, principalmente por la identificación de moléculas con la capacidad de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. En el proceso inflamatorio intervienen muchos mecanismos, algunos mediados por una variedad de moléculas de señalización y la activación de los factores de complemento (Nathan 2002). La regulación del mismo, es crucial para dar una correcta respuesta acorde frente al daño celular como también otorgar protección para impedir que ello ocurra. Los mediadores que participan en la respuesta inflamatoria pertenecen a diferentes clases químicas, tales como aminas biógenas (histamina, serotonina), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citoquinas, factores de crecimiento, factores activadores de colonia, factores de complemento, anticuerpos, quininas), especies reactivas de oxígeno (ROS, anión superóxido, hidroperóxido, radicales hidroxilos), y lípidos (factores activadores de plaquetas, prostanoídes, leucotrienos). Estos mediadores inician, mantienen, y modulan el curso de un gran número de enfermedades humanas tales como la liberación de esteroides antiinflamatorios e inmunosupresivos de la corteza adrenal, citoquinas como la interleukina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e IL-13, las cuales ejercen acciones pro y antiinflamatorias dependiendo de su participación en la respuesta inmunespecífica (Gilmore 2006, Safayhi & Sailer 1997). Debido a los innumerables agentes patógenos y lesivos ambientales existentes, la habilidad para desencadenar una reacción inflamatoria exitosa será esencial para la supervivencia de los individuos. Sin embargo, en algunas situaciones y enfermedades, esa reacción puede llegar a ser exagerada originando daño persistente para el individuo como ocurre en la FQ (Goodman A 2001, Smith et al 1996).

Una amplia variedad de plantas alimenticias como granos, frutas, legumbres, té, cerveza, uva, aceite de oliva, chocolate/cacao, café, nueces, maní, las especias, las frutas, verduras, etc contienen polifenoles (Bravo 1998). Una serie de productos naturales como el resveratrol y la curcumina, fueron ampliamente investigados y sometidos a ensayos clínicos como agentes inhibidores de la inflamación (Hatcher et al 2008). Aunque el conocimiento de la absorción, biodisponibilidad y metabolismo de estos compuestos no se conoce del todo, parece que algunos son bioactivos y son absorbidos en su forma nativa o modificada. Se sabe que después su metabolización por la microflora de los intestinos, sus formas absorbidas pueden ser detectadas en el plasma en un rango de concentración nanomolar (Rahman et al 2006).

Existen varios trabajos *in vivo* como *in vitro* que evalúan la actividad anti-inflamatoria de extractos o compuestos aislados de plantas (Newman 2003). Muchos de los productos naturales hallados, son utilizados como medicamento o plantillas para la producción de nuevos medicamentos, principalmente porque tienen una gran utilidad en el estudio de los blancos moleculares (Newman 2003). El análisis detallado de estas fuentes, ha determinado las estructuras de estos compuestos antimicrobianos y/o antiinflamatorios y se encontró que abarca un gran espectro de metabolitos que van desde los fenoles, quinonas, flavonoides, alcaloides, terpenoides y poliacetilenos como también azúcares, aldehídos, saponinas,

sulfóxidos, etc.(Mowrey 1990, Shetty K 2005, Vатtem 2005b). Las frutas como los arándanos, las fresas y las moras, hierbas como el orégano, romero, tomillo (Puupponen-Pimia et al 2005, Shetty K 2005, Vатtem DA 2005) y varias especias como la cúrcuma, clavo y pimienta negra, se han utilizado desde tiempos antiguos para prevenir patologías del tracto gastrointestinal, pulmonar y urinario.

Debido a que los productos naturales ofrecen una gran diversidad química de compuestos, ocupan un espacio adicional en el campo de la química farmacéutica si se los compara con aquellos de origen sintético. Varios estudios sugieren que los fitoquímicos de la dieta pueden dar lugar a una nueva categoría de sustancias antimicrobianas que podrían presentar un espectro más amplio y contribuir a solucionar el problema de la resistencia a los antibióticos (Mowrey 1990.) y a los efectos adversos de los antiinflamatorios convencionales.

1.5.1. Antecedentes

Desde 2005 en nuestro laboratorio, se estudian extractos principalmente del romero (Figura 1.7.) con el fin de buscar metabolitos con actividad antimicrobiana relacionadas a su composición fenólica (Moreno S 2006). La importancia del romero como otras plantas aromáticas se centró principalmente en sus aplicaciones tanto en la medicina popular como por su explotación comercial, ya que se utilizan como potenciadores de aroma y sabor, cosméticos y productos farmacéuticos (Boussaada et al 2008, Chipault JR 1952, Oluwatuyi et al 2004). Una de las características principales del romero es su actividad antioxidante, siendo un potencial candidato para ser utilizado en los alimentos, dado a que evita su deterioro a causa de la actividad antimicrobiana y a la oxidación de los lípidos alimentarios (Fernandez-Lopez et al 2005, Madsen HL 1996, Moreno S 2006).

Los principales compuestos antioxidantes que se encuentran en extractos etanólicos de romero son el ácido rosmarínico, ácido carnósico, y carnosol (Figura 1.8.) (Schwarz & Ternes 1992). El ácido carnósico y carnosol son diterpenos fenólicos, y el ácido rosmarínico es un éster de ácido caféico (3,4-dihidroxifenilactato fenólico). El ácido carnósico representa el constituyente principal de los diterpenos fenólicos contenidos en el romero (Munne-Bosch & Alegre 2001). Se sabe que el ácido rosmarínico se encuentra en cantidades considerable en varias especies de la familia de las *Lamiaceae*, y también en otras familias, como las *Borangiaceae* (De-Eknamkul & Ellis 1984, Shetty 1997). Los diterpenos fenólicos como el ácido carnósico y carnosol se encuentran predominantemente en *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*, ambos miembros de la familia *Laminaceae*(Cuvelier ME 1996).

En la medicina folclórica, se le reconoce al romero aplicaciones terapéuticas para una amplia gama de enfermedades tales como trastornos respiratorios, problemas estomacales y enfermedades inflamatorias (al-Sereiti et al 1999; Erenmemisoglu A 1997; Kültür 2007).

Estudios científicos demostraron diversas actividades para los compuestos fenólicos, entre ellas se observó que el carnosol ejercía actividad antiinflamatorio cuando se desafiaba con lipopolisacárido (LPS) a células peritoneales de ratón (Chan et al 1995). Posteriormente, se demostró que, el carnósico y el ácido rosmarínico reducían la formación de nitrito por LPS en las células RAW 264.7 (células de macrófagos murinos). El mecanismo anti-inflamatorio del carnosol sería a través de la inhibición de la producción del factor nuclear- κ B (NF- κ B), p38, y p44 dando lugar a una disminución en la activación de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y en consecuencia una reducción en la formación y liberación de óxido nítrico (NO). Además, se sugirió que este podría ser uno de los mecanismos de cómo los fitoquímicos, ingeridos en la dieta, podrían impedir la carcinogénesis asociado con la inflamación crónica (Lo et al 2002). Para el caso del ácido rosmarínico, se estudió que la inhibición de varios procesos inflamatorios dependía de la activación del sistema de complemento (Englberger et al 1988, Rampart et al 1986).



Figura 1.7. *Rosmarinus officinalis*. El romero es una hierba aromática de la familia de las *Lamiaceae*. El nombre viene del latín *ros* (rocío) y *marinus* (marino), por su intenso perfume y por habitar en los acantilados costeros del mediterráneo. Es un arbusto leñoso y perenne que crece espontáneamente en matorrales en compañía de otras plantas como el tomillo, la jara y el espliego. Puede alcanzar los 2 m de altura y tiene los tallos erectos y ramificados. Sus hojas son aromáticas de color verde, oscuro por el dorso y plateado por el revés, y las flores son de color azul pálido. Actualmente son crecidos en distintas partes del mundo con fines culinarios, como saborizante y aromatizante de comidas.

Estudios *in vivo*, realizados en modelos murinos de asma, demostraron que el extracto de romero disminuye la inflamación que acompaña a la reacción alérgica resultante de la exposición a los ácaros del polvo (Inoue 2005), como también el asma. Se determinó que originaba una disminución significativa en el número de eosinófilos, neutrófilos y células mononucleares alrededor de las vías respiratorias y en el líquido de lavado broncoalveolar (Inoue 2005). Asimismo, estudios clínicos llevados a cabo durante 21 días, doble ciego, a los que se les suministró un extracto de romero o placebo a pacientes con alergias estacionales mostraron que aquellos que recibieron el extracto experimentaron una disminución significativa en los síntomas generales, como la secreción nasal, ojos llorosos e irritados, en

comparación con los que les suministraron el placebo. Se vio también como el tratamiento, redujo significativamente el número de neutrófilos y eosinófilos en la mucosa nasal (Osakabe et al 2004, Sanbongi 2004, Takano et al 2004). Esto llevó a la conclusión de que el extracto de romero puede ser beneficioso para tratar pacientes con problemas respiratorios.

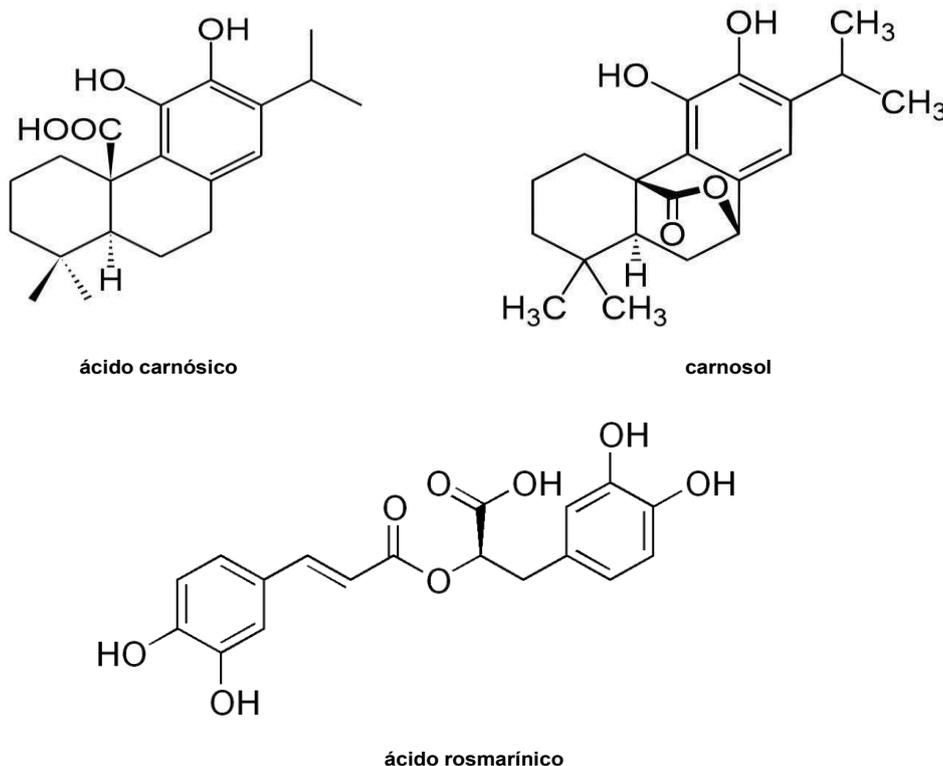


Figura 1.8. Compuestos mayoritarios presentes en las hojas de *R. officinalis*

1.5.2. Xilitol

Otro de los compuestos de interés que surge de la literatura es el xilitol. El xilitol es un azúcar reducido derivado de la hidrogenación de la xilosa perteneciente al grupo de los monosacáridos (Figura 1.9.). El interés industrial de este compuesto, está relacionada con sus propiedades como edulcorante no cariogénico y su uso en pacientes con diabetes dado a que se metaboliza independiente de la insulina (Oh 1998). A pesar de ser un poliol, el xilitol no es una hexosa, sino una pentosa que presenta cinco moléculas de carbono en su fórmula molecular ($C_5H_{12}O_5$; 1,2,3,4,5-pentahidroxipentanol), esta diferencia es suficiente para justificar sus acciones y lo que lo hace tan diferente de los otros azúcares de su grupo (Mäkinen 2000,

Peldyak 1996). Su mayor beneficio documentado es la promoción de la salud bucal; previene la desmineralización dentaria, la formación de placas y de caries por sus mecanismos de unión con el calcio y por su acción de inhibición y anti-adhesión sobre el *Streptococcus mutans* (Autio 2002). Para este fin, el xilitol puede ser utilizado bajo la forma de pasta de dientes, gel oral, soluciones, chicles y pastillas.

Experimentos *in vitro* demostraron una reducción en el crecimiento del *Streptococcus pneumoniae*, entre 35-72%, en concentraciones de 1-5% del xilitol en un medio de cultivo (Kontiohari 1995), reduciendo también la adhesión de este y del *Haemophilus influenzae* a las células de la nasofaringe (Kontiohari et al 1998). En estudios donde se realizó la exposición de cepas de *S. pneumoniae*, a medios de cultivo que contenían xilitol, produjo numerosas alteraciones estructurales y metabólicas en la bacteria como: disminución de las divisiones y de la formación de cadenas, aumento de las autólisis, disminución del diámetro de la cápsula e irregularidades de la pared celular (Tapiainen et al 2004).



Figura 1.9. El Xilitol es un azúcar de alcohol, usado como sustituto del azúcar. Se encuentra en forma natural en una gran cantidad de frutas y verduras: ciruelas, uvas, avena, maíz entre otras y es producido por el propio organismo (cerca de 5 a 15g/día). Para el uso comercial es extraído de la cáscara de la remolacha, del maíz y otras fuentes, pero también puede ser obtenido por biotecnología (Hallborn et al 1991). En 1963 la FDA aprobó su uso colocándolo en el grupo de sustitutos del azúcar y hoy en día se conoce como se metaboliza en el organismo (Peldyak 1996). Molécula de xilitol (a); Planta de maíz de dónde se obtiene xilitol (b); azúcar de xilitol (c).

Los estudios clínicos del xilitol en humanos demostraron una reducción significativa en los episodios de otitis medias agudas (OMA) en niños. (Gondim L 2005, Uhari M 1998, Uhari 1996). También se observó que el uso de este compuesto en *sprays* nasales, disminuye la rinitis alérgica y los episodios de rinosinusitis (Peldyak 1996).

Se ha demostrado una reducción de los casos de rinosinusitis en conejos, a los que se les realizó lavados nasales con una solución que contenía xilitol cuando se le inoculaban simultáneamente bacterias como *P. aeruginosa* (Brown et al 2004). En relación a su acción en las vías aéreas, se verificó que disminuye la concentración de sal del líquido bronqueo-alveolar que baña la superficie celular. Esto se debe a que al ser un compuesto no iónico y con baja permeabilidad trans-epitelial, en concentraciones superiores a 4.5% en la superficie de la

mucosa, altera la osmolaridad (Zabner 2000), disminuyendo las concentraciones de sal por el aumento del agua local, lo que a su vez aumenta la actividad de las células del sistema inmunológico (Tapiainen 2002, Zabner 2000) mejorando la inmunidad local y previniendo las infecciones pulmonares, siendo inclusive ponderado para su utilización en los casos de fibrosis quística teniendo en vista el mecanismo propio de esta patología (Brown 2004, Zabner 2000).

Este trabajo de Tesis se centró en evaluar los compuestos mencionados frente a *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO1, principal patógeno asociado al deterioro pulmonar en pacientes con fibrosis quística. Hemos observado que los compuestos evaluados influyen en la expresión de ciertos factores de virulencia de PAO1, como también en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados son descriptos y discutidos en esta Tesis.

HIPÓTESIS

Hoy día, el interés por las sustancias antimicrobianas y anti-inflamatorias de origen vegetal va en aumento porque ofrecen en algunos casos, ventajas en relación a los medicamentos y a los anti-inflamatorios clásicos; entre ellas la baja incidencia de efectos secundarios. Dado a que dichos fitoquímicos derivan de fuentes de la ingesta diaria, se los reconoce como seguros y muy rara vez se les asocia efectos colaterales como ocurre con los medicamentos de uso tradicional (Cowan 1999, Mowrey 1990., Vatterm 2005).

La identificación o evaluación de compuestos naturales con actividad frente a *P. aeruginosa* permitiría detectar sustancias de interés para ser empleadas potencialmente en enfermedades en las que las infecciones por esta bacteria y los procesos inflamatorios asociados a ella, contribuyen al deterioro del paciente que las padece. En particular, compuestos naturales con actividad, tanto antimicrobiana y/o actividad anti-inflamatoria contra esta bacteria, podrían ser utilizados en tratamientos para pacientes con fibrosis quística. Alternativamente, el hallazgo de compuestos capaces de disminuir la producción de factores de virulencia resultaría de particular interés dado a que la bacteria se tornaría menos patógena y se detendría el desarrollo o avance de la enfermedad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar la acción de compuestos bioactivos de la planta de romero (*R. officinalis*) y del xilitol, sobre el patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y sobre modelos de inflamación tanto *in vitro*: utilizando líneas celulares murinas y humanas, e *in vivo* empleando la cepa de ratón Balb/c.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar potenciales actividades de extractos de *R. officinalis* y de sus compuestos fenólicos puros (ácido rosmarínico, ácido carnósico y carnosol), sobre el *P. aeruginosa*.
2. Estudiar el efecto de estos compuestos naturales sobre los factores de patogenicidad regulados por el *quórum sensing* en PAO1.
3. Determinar la actividad anti-inflamatoria de *R. officinalis* y sus derivados *in vivo* en ratones Balb/C bajo diferentes modelos de edema.
4. Evaluar la actividad del xilitol sobre PAO1, utilizando como modelo celular el epitelio bronquial pulmonar humano Calu-3.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2. Cultivos procariotas y condiciones de cultivo

2.1. Cepas Bacterianas

Para el estudio del romero y el xilitol se empleó la cepa PAO1. También se evaluó la acción del romero sobre aislados clínicos provenientes de pacientes con FQ diagnosticados en el Centro Nacional de Genética Médica (Malbrán-ANLIS) y dónde se obtuvieron las cepas: 956, 957, 958, 959, FQsens, FQres. Las mismas fueron obtenidas y cedidas por el Dep. Médico de la Facultad de Medicina-UBA; además se incluyeron las cepas *B. cepacia* II, *Stafilococcus aureus* ATCC 25923, *Escherechia. Coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y un aislamiento de aguade *P. aeruginosa*, todas cedidas por el Departamento de Microbiología del Instituto Malbrán-ANLIS. PAO1-GFP, se empleó para microscopía de fluorescencia. La detección de homoserin lactonas se llevó a cabo con las cepas: *A. tumefaciens* NTL4 (pCF218 y pCF372) (gentamicina 100 mg/L y tetraciclina 2 mg/L) (Luo et al 2004) y *C. violaceum* CV026 (McClellan et al 1997). *Escherechia coli* llevando los plásmidos pME3853 (*lasI::LacZ*) y pME3846 (*rhII::lacZ*) se empleó para la transfección (Pessi et al 2001) de PAO1 y posterior estudio del quorum sensing. *Stafilococcus aureus* ATCC 25923 también fue utilizada para el ensayo de *LasA*.

2.2. Condiciones de cultivo y conservación de cepas

P. aeruginosa, *B. cepacia*, *E. coli*, *S. aureus* ATCC 25923, CV026 y NTL4 fueron crecidas en Luria-Bertani o LB (LB: triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1% y NaOH para neutralizar el pH) a 37°C o 28°C de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento de cada organismo. Para evaluar actividad antimicrobiana se utilizó Mueller Hinton (Britania) ajustado con cationes Ca^{2+} y Mg_2 de acuerdo a los requerimientos del fabricante. Los ensayos de motilidad se llevaron a cabo en medio mínimo FAB (mM): 0.1 $CaCl_2$, 0.01 Fe-EDTA, 0.15 $(NH_4)SO_4$, 0.33 Na_2HPO_4 , 0.2 KH_2PO_4 , 0.5 NaCl y se agregó casaminoácidos 1% (g/vol.) y $MgCl_2$ 1 mM. Las cepas de Línea celular murina

2.3. Línea celular

2.3.1. Línea celular murina

La línea celular de macrófagos murinos, Raw 264.7, fue crecida a 37°C y 5% CO₂-95% aire, en medio Dulbecco's modificado Eagle's medium (DMEM), conteniendo suero fetal bovino al 10% (vol./vol.) (FBS, Bioser, Argentina), 2 mM glutamina, 100 IU/ml penicilina and 100 µg/ml estreptomycin.

2.3.2. Línea celular humana

Las células Calu-3 se crecieron en monocapa en botellas de cultivo de 75 cm² con medio de cultivo DMEN (Gibco, Invitrogen) suplementado con 10% de SFB (Gibco, Invitrogen), 50 µg/mL gentamicina (Gibco, Invitrogen), 2 mM de glutamina (Gibco, Invitrogen) y amino ácidos esenciales (Gibco, Invitrogen).

2.4. Congelamiento y descongelamiento de las células

2.4.1. Descongelamiento

El criotubo conteniendo las células, fue retirado del nitrógeno líquido y se sumergió en un baño de agua a 37°C con agitación constante. Inmediatamente después del descongelamiento, las células se pasaron a una botella de 75 cm² con 10 ml del medio de cultivo descrito anteriormente. A las 2 o 3 horas, una vez adheridas al fondo, el medio fue reemplazado por medio fresco, para eliminar los restos de DMSO (dimetil sulfóxido) presentes en el medio de congelamiento. Las células se dejaron crecer en estufa a 37°C, con una atmósfera de aire saturado de agua y con 5 % de CO₂.

2.4.2. Congelamiento

Con el fin de preservar las características originales de la línea celular, luego del descongelamiento y replicación, se procedió a congelar parte de las células obtenidas. El rango de concentración celular utilizado osciló entre 2 y 8 x 10⁶ cél./ml/criotubo. Las células subconfluentes se trataron con una solución de tripsina-EDTA (0,25 % tripsina / 0,02 % EDTA en PBS 1X), aproximadamente durante 5 minutos, hasta que las células se disgregaron. Luego se inactivó la tripsina utilizando medio de cultivo suplementado con 10 % de suero fetal bovino y las células se centrifugaron a 400 xg durante 5 minutos. El medio sobrenadante se descartó y se resuspendieron las células en medio de congelamiento (10% DMSO, 50% suero fetal bovino, 40% de medio DMEM). Posteriormente, se incubaron en hielo durante 15 min, luego se almacenaron a -70°C durante 16 horas (dentro de un recipiente de telgopor para disminuir la pendiente de congelamiento) y finalmente a -196°C, en un termo con nitrógeno líquido.

2.4.3. Compuestos y reactivos empleados

Los compuestos químicos empleados en este estudio fueron forbol 12-miristato 13-acetato o PMA (Sigma, St. Louis, USA), formaldehído (Merck Química Argentina S.A.I.C, Argentina), ácido carnósico (CA), carnosol (CS), y ácido rosmarínico (RA) (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland); xilitol y tobramicina (provisto por el Laboratorio Pablo Cassará S.R.L.);

indometacina (Montepellier, Argentina). Estos fueron agregados a las dosis indicadas en cada experimento. Plantas de *R. officinalis*, fueron obtenidas de la provincia de San Luis, Argentina. Los discos de antibióticos ($\mu\text{g/ml}$) GEN 10; CAZ 10 y TOB 30 fueron empleados para conocer la resistencia antibiótica de las cepas.

2.4.4. Preparación de los extractos de romero

Para la obtención del extracto etanólico de romero, se empleó el método de extracción por Soxhlet como describe Moreno y col. (Moreno S 2006). La extracción Soxhlet consiste básicamente en el lavado sucesivo de una mezcla sólida con un determinado solvente, que va extrayendo de la mezcla, los componentes más solubles en él. Mediante el lavado sucesivo de la mezcla, se extraen componentes cuya solubilidad en el solvente extractante es muy baja, debido al efecto acumulado de las múltiples extracciones. Este método es ampliamente utilizado para la extracción de compuestos fitoquímicos. Una vez obtenido el extracto de romero, se corroboró la composición del mismo mediante la técnica de cromatografía de alta presión o HPLC equipado con una columna de fase reversa C-18, para determinar la presencia de compuestos fenólicos (Moreno S 2006).

2.5. Ensayo de viabilidad

La bacteria se creció previamente en Luria-Bertani (LB) durante toda la noche a 37°C y 250 rpm. Posteriormente se resuspendió el precipitado a una $\text{D.O}_{600\text{nm}}$ equivalente a 0.01 en medio Mueller Hinton ajustado con cationes como indica el fabricante (DIFCO), en presencia o ausencia de los compuestos en estudio a las dosis indicadas. Los cultivos fueron sometidos durante 24 h a 200 rpm a 37°C y a distintos tiempos, se tomó $100\ \mu\text{l}$ de la muestra y se leyó el crecimiento en un espectrofotómetro a 600 nm de longitud de onda. Los resultados obtenidos se representaron gráficamente como $\text{D.O}_{600\ \text{nm}}$ vs horas, para correlacionar el crecimiento en función del tiempo. Para el ensayo viabilidad en placa de Petri se empleó el mismo medio al que se le adicionó agar al 1.8%. Al momento de utilizar el medio se calentó para derretir el agar y una vez que alcanzó la temperatura ambiente se le agregó las concentraciones de los compuestos señaladas. Una vez que solidificó se agregaron 5×10^4 UFC/ml de cada una de las cepas bacterianas mencionadas. Para determinar la susceptibilidad a los antibióticos se realizó un césped de cada una de las bacterias con un hisopo estéril partiendo de un cultivo crecido toda la noche y se agregaron los discos de antibióticos a las placas. Los resultados se revelaron luego de 24 h de crecidas las bacterias a 37°C .

2.6. Determinación de formación de biofilm y tinción con cristal violeta.

Los ensayos de *biofilm* se llevaron a cabo sobre placas de poliestireno. Para ello las bacterias fueron crecidas en agitación en LB a una temperatura constante de 37°C y a 200 rpm. Luego de 24 h, se registró la densidad óptica a 600nm, y se diluyó el cultivo en medio

mínimo FAB o LB a 0.01. Una alícuota de 150 µl de los cultivos fueron colocados en pocillos de placas de poliestireno (96 pocillos) junto con el compuesto en estudio a las dosis indicadas en los ensayos. Luego de 24 horas de incubación estática en una estufa a 37°C, se procedió a medir el *biofilm* formado. El *biofilm* se cuantificó utilizando una modificación de la técnica de tinción con cristal violeta descrita por O' Toole (O'Toole et al 1999). Brevemente, al finalizar el tiempo de incubación se aspiraron cuidadosamente de los pocillos las bacterias no adheridas (las que no desarrollaron *biofilm*) empleando una pipeta multicanal y se lavaron una vez con una solución estéril de NaCl 0,9%. Luego se los incubó por 30 min con 150 µl de una solución 0,1% de cristal violeta (CV) y se los lavó dos veces con agua destilada. La cuantificación de bacterias unidas fue realizada agregando 200 µl de etanol 95% a cada pocillo teñido con CV para lograr solubilizar el pigmento y luego se midió la absorbancia utilizando un lector de ELISA a 570 nm (7520 microplate lector, Cambridge Technology, Inc.). El ensayo fue repetido tres veces por quintuplicado. Para graficar los resultados se relativizó el *biofilm* con el crecimiento con las DO de las bacterias:

$$\text{Biofilm relativo} = \frac{CV_{570}}{DO_{600}}$$

donde CV es la medición del colorante cristal violeta a 570 nm relativizado con la densidad óptica a 600 nm que corresponde al crecimiento de la cepa.

2.7. Susceptibilidad del *biofilm* formado por PAO1 en presencia de CA y tobramicina.

El efecto de la tobramicina sobre el *biofilm* de PAO1 formado en presencia de CA fue determinado de acuerdo a Al-Bakri con algunas modificaciones (Al-Bakri et al). El ensayo consistió en tomar 100 µl de medio mínimo suplementado con casaminoácidos, conteniendo 0,01 (O.D₆₀₀ nm) de bacterias a las que por un lado se crecieron en presencia de CA (5 µg/ml) y otras únicamente en medio mínimo (control). Al día siguiente se removió el cultivo y se agregó a un grupo medio fresco sólo, a otro medio con CA (5 µg/ml) o medio con TOB(10 µg/ml), dejando la placa a 37°C por 24 horas más. La cuantificación de *biofilm* se realizó de la misma manera descrita anteriormente, empleando CV y normalizando el valor obtenido con el crecimiento bacteriano, y se colocó en una placa de 96 pocillos, dejándola por toda la noche a 37°C. El porcentaje de bacteria unida se cuantificó por cristal violeta (Caiazza & O'Toole 2004).

2.8. Ensayos de motilidad

2.8.1. *Swimming* y *swarming*

El *swimming* y el *swarming* se examinaron sobre placas que contenían 0.3% y 0.5% (g/l) de agar respectivamente. Los compuestos evaluados se incorporaron a la placa a las concentraciones finales indicadas en medio LB de acuerdo al compuesto en estudio. Todos los

experimentos de *swimming* y *swarming* se repitieron 3 veces en ensayos independientes. Las placas se inocularon con 2 μ l de un cultivo crecido durante toda la noche en medio LB a 37°C y con agitación a 200 rpm. Para observar si la motilidad se encontraba afectada por los compuestos estudiados, las placas de *swimming* se incubaron durante 20 h a 37°C (Overhage J 2008)(Murray & Kazmierczak 2006). Las placas de *swarming* se secaron durante una hora antes de la inoculación con la bacteria y se incubaron a 30°C de acuerdo a la bibliografía (Tremblay & Deziel 2008).

2.8.2. Twitching

El *twitching* fue evaluado por el método descrito por Semmler (Semmler et al 1999). Las cepas se crecieron durante toda la noche a 37°C en medio LB y al día siguiente se inocularon atravesando la capa de agar (1,5%) con un palillo llegando hasta la base de la placa de Petri. Posteriormente, las placas inoculadas, se crecieron durante toda la noche a 37°C para visualizar la zona de *twitching*, la cual se desarrolla como un halo alrededor de la colonia entre el agar y la superficie de la placa. Para poder visualizarlo, se colocaron 6 capas de papel de filtro Whatman™ con el objetivo de deshidratar el agar. Luego de 2 h se removió el papel y se tñieron con coomassie brilliant blue 250 al 1% durante 20 minutos (Shan et al 2004). Las placas fueron decoloradas por 3 horas con 10% de etanol y 10% ácido acético, y se las dejó secar durante 1 hora a temperatura ambiente.

2.8.3. Ensayo de *swarming* empleando filtros de papel impregnados con CA.

Para determinar si el CA podría repeler el *swarming* bacteriano, se impregnaron discos de papel de filtro Whatman™ con una solución de CA. Los filtros (filtros de papel 40, Ashless; Whatman) se cortaron con un sacabocados de 7 mm y se esterilizaron por autoclave. Los discos se impregnaron con las dosis de CA indicadas, y se secaron a temperatura ambiente en flujo laminar, protegidos de la luz, y asépticamente ubicados sobre las placas de *swarming* antes de la inoculación bacteriana (O'May C 2011). A distintos tiempos se inspeccionaron las placas para observar que ocurría con el desplazamiento de la bacteria sobre la placa. El experimento se realizó por triplicado, dos veces.

2.9. Medición de factores de virulencia

2.9.1. Extracción de piocianina

La cepa PA01 crecida toda la noche a 37°C en medio LB, se diluyó a una OD₆₀₀ final de 0.2 e incubado con diferentes concentraciones de xilitol por 24 h en 4 ml de LB. La piocianina fue extraída con 1.5 ml de cloroformo. El cloroformo fue transferido a un tubo limpio y se le agregó 0.8 ml de 1 N HCl y se lo agitó para extraer la piocianina a la fase acuosa, dando como resultado una coloración rosada. La cuantificación de piocianina se realizó a OD₄₉₀ y la concentración se determinó multiplicando esa medida por 17.07 (Drenkard 2003).

2.9.2. Medición de la actividad de las proteasa

La actividad de las proteasas producida por *P. aeruginosa* se determinó empleando el método descrito por Al-Ansari, S.M. Una alícuota de 125- μ l de una solución de 2% de azocaseína en buffer Tris pH 7.8 (100mM), se incubó con 75 μ l del sobrenadante bacteriano tratado o no con el compuesto en estudio, a 37°C a distintos tiempos durante 120 min en lector de ELISA a 440 nm y se expresó en función de la muestra control expresada en %. El ensayo se repitió tres veces por quintuplicado.

2.9.3. Ensayo de actividad de *LasA* en sobrenadantes de PAO1

La presencia de la enzima *LasA*, fue determinada empleando un cultivo de *Staphylococcus aureus* inactivados por calor. Brevemente, 30-ml de un cultivo crecido en LB toda la noche a 28°C se hirvió por 10 min a 10,000 \times g. El pellet resultante se resuspendió en 10 mM de Na_2PO_4 (pH 7.5) a una DO_{600} aproximada de 0.8. Luego, 100- μ l del sobrenadante de PAO1, crecido en presencia del compuesto en estudio fue agregado a 900 μ l de la suspensión de *S. aureus*. La actividad de la proteasa *LasA* se registró a una DO_{600} a distintos tiempos durante 45 minutos.

2.9.4. Ensayo de elastasa *LasB*

La actividad elastolítica de *P. aeruginosa* fue evaluada empleando elastina rojo congo (ERC, 15 mg/ml of Sigma, Mo.) (Rust et al 1994). La bacteria fue crecida toda la noche en medio LB y se inoculó 2 μ l sobre la placa que contenía el compuesto en estudio disuelto junto con ERC, LB-agar (1.8% w/v). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 y 48 h, para visualizar el halo de actividad de *LasB* alrededor de la colonia (Figura 1). Sobre la placa se inoculó 2 μ l de la bacteria sobre una placa conteniendo elastina-rojo congo con o sin el compuesto a estudiar (A). Las placas se examinaron a las 24 y 48 h para ver la presencia del halo de inhibición (B).

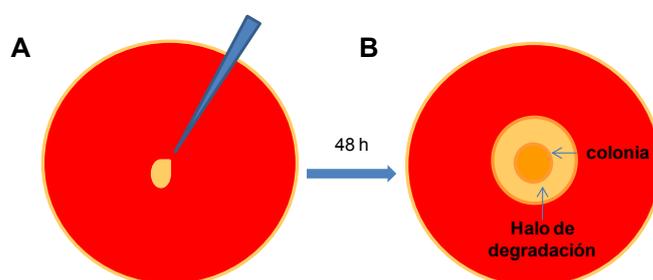


Figura 1. Esquema representativo del ensayo de *LasB* con elastina rojo congo.

Los datos fueron procesados tomando la relación entre el diámetro del halo y el diámetro de la colonia y se relativizó el área de degradación con el área total correspondiente a la placa de petri. El ensayo se realizó 3 veces y se promedió los valores obtenidos.

2.10. Obtención y detección de AHL

2.10.1. Extracción de AHLs a partir de un cultivo de *P.aeruginosa* PAO1.

Las AHLs se obtuvieron a partir de sobrenadantes de cultivo de PAO1. Para ello se tomó 2.5 ml de cultivo crecido toda la noche en presencia o ausencia de los compuestos en estudio. La bacteria se removió por centrifugación a 10000 rpm. El precipitado fue descartado y el sobrenadante se trató dos veces con iguales volúmenes de acetato de etilo-0.1% ácido acético. La fase que contenía las AHLs se retuvo y se evaporó hasta la sequedad en un concentrador (Eppendorf concentrador 5301). El precipitado resultante se disolvió en 100 μ l de acetato de etilo calidad HPLC (Shaw et al 1997).

2.10.2. Cromatografía en placa delgada

Luego de la extracción de AHLs del sobrenadante de PAO1, se tomaron 4 μ l y se aplicaron en una placa C18 de fase reversa (placa de 200 mm; Merck) y los cromatogramas se desarrollaron con metanol/agua (60:40, vol/vol) hasta que el frente de corrida llegó a la parte superior de la placa quedando por debajo de los 2 cm de altura. Luego, se dejó evaporar el solvente y las placas se secaron a temperatura ambiente. La placa cromatografía fue cubierta con la cepa NTL4 o CV026, indicadora de homoserin lactona. Para ello un cultivo de 5 ml de NTL4 (pZLR4) o CVO26, se inoculó con 50 ml de medio AB o LB, de acuerdo la cepa, crecido hasta la fase exponencial tardía. Los 50 ml de cultivo se agregó a 100 ml de medio conteniendo 1.5 g de agar derretido. Cuando se empleó NTL4 (pZLR4) se agregó 80 μ g/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranoside (X-Gal) al medio de cultivo. El cultivo se mezcló vigorosamente para favorecer la distribución homogénea de las bacterias y se esparció sobre la placa cromatográfica para producir una capa uniforme de agar. Una vez solidificado el agar, la placa se cubrió y se incubó a 28°C en una caja plástica esterilizada dejándola por 24-48 h hasta que se visualizó el desarrollo de color indicador de presencia de AHLs.

2.10.3. Ensayo de β -galactosidasa

Para determinar actividad de β -galactosidasa empleando una modificación del método de Miller (Miller 1972) por Zhang y Bremer (Zhang & Bremer 1995). El protocolo consiste en crecer las bacterias bajo las condiciones de estudio elegidas, es decir en presencia o ausencia del compuesto en estudio durante toda la noche. Luego de 24 h se registró la densidad celular del cultivo de bacterias a una D.O de 600nm, de allí se tomaron 20 μ l y se mezclaron junto con 80 μ l de la solución de permeabilización, solución que contiene detergente para fragmentar la membrana celular, dejando las enzima β -Gal libre y así poder obtener un registro de su actividad. Luego de la incubación durante 20 minutos a 30°C, se añade 600 μ l de la solución que contiene el sustrato ONPG, y se deja hasta que se observa un color amarillento de la suspensión, debido a la hidrólisis del ONPG dando como resultado o-nitrofenol. La reacción ocurre dentro de los 30 a 90 minutos iniciada la reacción. Una vez que vira la solución se

añade 700 µl de la solución "stop", se registra el tiempo que fuga la muestra para decantar el detritus celular registrándose finalmente la absorbancia a 420 nm. Se considera aceptable una absorbancia de 420 nm entre 0.05 y 1.

Las unidades de Miller se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$1000 \times \frac{(\text{Abs}_{420})}{(\text{Abs}_{600} \text{ del cultivo}) \times (\text{volumen } 0.02 \text{ ml}) (\text{tiempo de reacción})}$$

Composición de las soluciones empleadas:

Solución de permeabilización: Na₂HPO₄ (100 mM); KCl 20 mM; MgSO₄ 2mM; CTAB (bromuro de hexadecil tri-metil-ammonio) 0.8 mg/ml, de oxicolato de sodio 0.4 mg/ml; L-β-mercaptoetanol 5.4 µl/mL.

Solución sustrato: Na₂HPO₄ 60 mM; NaH₂PO₄ 40 mM; O-nitrofenil-β-D-galactosido (ONPG) 1 mg/ml; b-mercaptoentanol 2.7 µl/mL.

Solución Stop Se empleó carbonato de sodio 1M (Na₂CO₃). El pH de la solución stop denaturaliza la β-Gal y duplica la intensidad del color de la reacción.

2.11. Preparación de células electrocompetentes procariotas

2.11.1. Condiciones de cultivo

Las células electrocompetentes PAO1 se prepararon de acuerdo al protocolo descrito por "*Methods in molecular Biology*" (Nickoloff 1995). El método consiste en inocular 10 ml de medio LB con una colonia de PAO1. Luego de crecer toda la noche a 37°C a 200 rpm, se tomó 1 ml de ese cultivo para agregarlo a 50 ml de LB fresco, bajo las mismas condiciones mencionada anteriormente, hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 0.5-1. A partir de allí se procedió como se describe a continuación:

De esa suspensión se tomó 20 ml y se lo centrifugó a 2300 g durante 10 minutos a 4°C.

1. Se removió, se descartó el sobrenadante y se resuspendió suavemente en 20 ml de medio MEB (Hepes 0.240 g/l, MgCl₂.H₂O 0.203 g/l) frío. Se centrifugó a 2300 g a 4°C durante 10 minutos. Este paso se realizó dos veces.
2. El medio MEB fue removido y se resuspendió en 1 ml de ese mismo medio frío y se centrifugó a 2300 g a 4°C durante 5 minutos.
3. Luego de remover el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 100 µl de MEB.
4. Esto se guarda a -80°C hasta su uso.

2.11.2. Preparación de ADN plasmídico

1. Se creció *E.coli*, que llevaba el plásmido pME3846 y pME3853 37°C durante 20 horas en 5 ml de LB con el antibiótico correspondiente.
2. Se tomaron 1,5 ml del cultivo y se lo centrifugó a máxima velocidad por 1 minuto
3. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en buffer TE 10 mM (Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.5).
4. Luego se realizó una hidrólisis alcalina agregando una solución de NaOH 0,2M y SDS 1% (m/v). Se mezcló por inversión.
5. Se agregó una tercera solución de AcNa 3M y AcK 5M.
6. Se incubó la mezcla por 5 minutos a temperatura ambiente
7. Se centrifugó a máxima velocidad durante 10 minutos para separar el precipitado de ADN cromosomal y proteínas.
8. El sobrenadante se incubó con ARNasa por una hora a 37°C.
9. Al finalizar esta incubación se separó el ADN de la enzima mediante una extracción con cloroformo.
10. Para precipitar el ADN se agregó 0,7 volúmenes de isopropanol y la incubación del mismo a -20°C durante 40 minutos.
11. Se centrifugó la mezcla y al pellet obtenido se lo lavó con etanol 70% y resuspendió en 20 µl de agua miliQ.

2.11.3. Transformación de células electrocompetentes

Para obtener bacterias transformadas se agregaron a 40 µl de células electrocompetentes entre 1 y 4 µl de los plásmidos en un rango de 50 a 200 ng/µl. Se incubó por unos minutos la mezcla en hielo y las bacterias se electroporaron utilizando en todos los casos, los siguientes parámetros: 25µF, 2,5 kV y 200 Ω. Se dejaron recuperando en SOC (triptona 20 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 0.5 g/l; KCl 2.5 g/l y glucosa (1M) 20 ml/L) durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se colocó en una placa con el antibiótico de selección y se lo incubó a 37°C por 24 h.

2.12. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas fue medida por el método de Bradford (Bradford 1976).

2.13. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria *in vivo*.

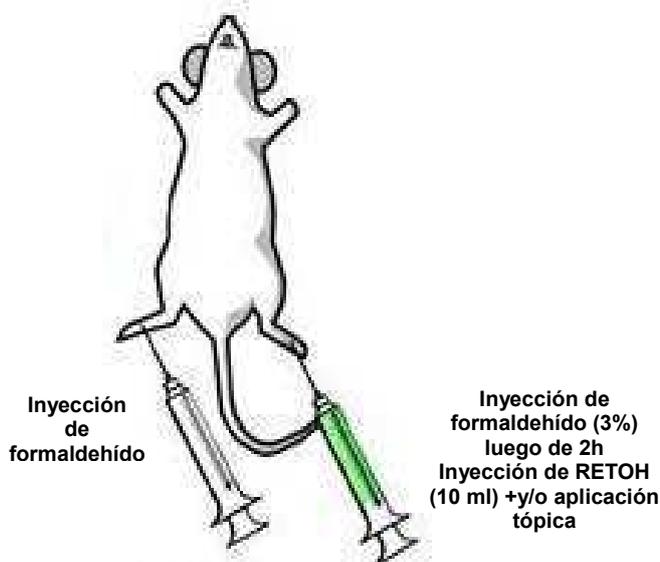
2.13.1. Consideraciones bioéticas:

Se emplearán ratones de la cepa Balb/c de 20-25 g de peso. Los mismos serán alojados bajo condiciones estándares de laboratorio. Descripción de la sala: la misma está provista de aire acondicionado con 10-15 cambios de aire por hora. La temperatura y humedad relativa de las habitaciones varían de 22 ± 3°C y 30-70% respectivamente. Se someterán a los animales a

fotoperíodos de 12 h. luz-12 h. oscuridad y se colocaran en jaulas de acero las cuales tendrán un máximo de 4 ratones, 1 por cada tratamiento. Las jaulas poseen camas de viruta limpia controlada microbiológicamente. Se administrará alimento de mantenimiento (GEP SA FEEDS – CARGILL) y agua ad libitum. El número de animales de experimentación no excederá más de la cantidad dispuesta por la Academia Nacional de los Estados Unidos (National Academy of Sciences, Washington, USA, 1996). El estudio asegura el correcto cumplimiento de todos los procedimientos operativos estándares involucrados y se encuentra bajo los lineamientos de las buenas prácticas de laboratorio (OECD, Paris, 1998), y de acuerdo a las recomendaciones sobre el uso y cuidado de los animales de laboratorio de la Academia Nacional de los Estados Unidos (National Academy of Sciences, Washington, USA, 1996).

2.13.2. Modelo de edema plantar inducido por formaldeído

Se llevaron a cabo ensayos para evaluar los efectos de un extracto etanólico sobre la inflamación aguda. El protocolo empleado fue el descrito por Suleyman et al., 2002 (Suleyman et al 2002), con algunas modificaciones. La inflamación aguda fue inducida por inyección de 20 μ l of formaldeído al 3% en buffer fosfato salino (PBS) en la región sub-plantar de ambas patas. El control recibió únicamente el vehículo. A las 2 h, la pata izquierda fue tratada con 10 μ l of RETOH (12 mg/ml) (ver Esquema 2.1).



Esquema 2.1. Imagen representativa del modelo de edema plantar inducido por formaldeído

Los ratones se dividieron en grupos, para evaluar los diferentes métodos de administración. El primer grupo recibió aplicación tópica, al segundo se le inyectó el compuesto y el tercero recibió ambos tratamientos (aplicación tópica e inyección). Luego de 4 h, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y se midió el diámetro del edema con un calibre. Para determinar la proporción de edema reducido se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Reducción del Edema(\%)} = 100 - \left[\frac{\text{EP}}{\text{A}} \times 100 \right]$$

dónde EP es el edema producido, siendo la diferencia entre los diámetros de las patas derechas e izquierda (pata derecha-pata izquierda) de los animales con el mismo tipo de aplicación.

2.13.3. Modelo de edema de oreja de ratón

El modelo empleado fue el descrito por Della Loggia et al., 1994 (Della Loggia et al 1994) Esquema 2.2. La actividad anti-inflamatoria se evaluó en ratones Balb/c (n=10 por grupo) como la inhibición del edema inducido por PMA (25 ng/cm²). Este agente irritante fue aplicado sobre la superficie cutánea interna de ambas orejas y esta condición fue considerada como el 100% de la actividad inflamatoria. Las dosis estudiadas para el ensayo fueron de 0,10, 20, 100, 250, 500, o 1000 µg/cm² de RETOH y 2, 10 or 20 µg/cm² para CA o CS y se aplicaron tópicamente en la cara interna de la oreja derecha del ratón, 30 min posterior a la aplicación del inductor inflamatorio. Como control de actividad anti-inflamatoria conocida se empleó indometacina. Luego de cuatro horas terminado el experimento los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se removió con un sacabocados (6 mm Ø) un segmento de cada una de las orejas para su posterior análisis.



Esquema 2.2. Imagen representativa del edema de inflamación en oreja de ratón.

La actividad anti-inflamatoria (AI) fue determinado como:

$$\text{AI} = \frac{\text{Peso del control} - \text{Peso del tratado}}{\text{Peso del control}} \times 100\%$$

Dónde: **Peso del control** corresponde a: peso del segmento derecho – peso de la segmento izquierdo de los animales controles

Peso del tratado corresponde a: peso de la oreja derecha – peso de la oreja izquierda de los animales a los que se les dio la misma dosis de compuesto a estudiar.

La actividad anti-inflamatoria se expresó como porcentaje del edema reducido en los tratados comparados con los controles. La dosis efectiva 50% (EC₅₀) se determinó empleando una regresión no lineal empleando una curva dosis respuesta no sigmoidea.

2.13.4. Ensayo de irritabilidad dérmica.

El ensayo de irritabilidad dérmica fue realizado por un laboratorio tercerista, Microquim. Brevemente el estudio fue desarrollado en conejos machos, sanos, de la raza Nueva Zelanda, con un peso no menor a 1,5 Kg, llevándose a cabo una prueba aguda de exposición simple. Se aplicaron 30 mg/cm² de extracto de romero etanólico sobre la piel previamente rasurada de los animales. La formación de eritema y edema fue observada a las 0,5, 1, 24 ,48 y 72 horas después de finalizada la exposición, que fue de 4 horas.

2.14. Preparación de ARN y síntesis de ADNc

2.14.1. Extracción de ARN.

Se realizó la extracción de ARN a partir de orejas de ratón tratadas o no con los compuestos en estudio empleando TRIZOL® (Invitogen). Para cuantificar la cantidad de ARN y corroborar su calidad en cada muestra se hicieron electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Antes de realizar el gel se limpió todo el material con una solución de NaOH 0,5M por 30 minutos y luego se enjuagó con agua MiliQ.

Tratamiento con RQ1 DNAasa (Promega), para eliminar el ADN de las muestras:

1. 10 µl de ARN, 1 µl de enzima y 1 µl de buffer
2. 30 min a 37 °C
3. agrego 1 µl de solución stop
4. 10 min a 65 °C

2.14.2. Síntesis de ADNc

1. ARN tratado con DNAasa 5 µl
2. H₂O miliQ 7 µl
3. La mezcla se incubó durante 5 min a 70 °C y 5 minutos en hielo.
4. Luego se agregó la siguiente mezcla:
5. Buffer 5X 5µl
6. dNTPs 10 µM 5µl

7. M-MLVRT 1 μ l
8. RNA sin 1 μ l
9. Se incubó todo por 1 hora a 43 °C.

Las PCRs para determinar la expresión de los genes a partir del ADNc fueron realizadas con los oligonucleótidos especificados.

2.14.3. Análisis por RT- PCR

Una vez obtenidas las muestras se guardaron rápidamente en nitrógeno líquido para luego ser homogenizadas en TRIZOL (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. El ARN se obtuvo empleando el Total RNA kit (Bioamerica, Inc.) y se determinó la concentración de ARN midiendo la absorbancia a 260/280 nm. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso. El ADN complementario fue sintetizado a partir de una reacción de retrotranscripción a 42°C durante 60 min en un ciclador térmico T-18 (IVEMA). Los cebadores fueron diseñados en base a la cadena complementaria de ADN, las secuencias para COX-1, COX-2, IL-1 β , ICAM-1, TNF- α , fibronectina, y gliceraldehido-3 fosfato dehidrogenasa (G3PDH). Las secuencias de los cebadores para la reacción en cadena de polimerasa (PCR) fueron las siguientes:

Gen	secuencia 5'-3'	longitud del fragmento (bp)	uso
cox-1 S	TGC ATG TGG CTG TGG ATG TCA TCA A	450	RT-PCR
cox-1 AS	CAC TAA GAC AGA CCC GTC ATC TCC A		RT-PCR
cox-2 S	ACT CAC TCA GTT TGT TGA GTC ATT C	583	RT-PCR
cox-2 AS	TTT GAT TAG TAC TGTAGG GTTAAT G		RT-PCR
IL-1β, S	TGC AGA GTT CCC CAA CTG GTA CAT C	387	RT-PCR
IL-1β, AS	GTG CTG CCT AATGTC CCC TTG AAT C		RT-PCR
TNF-α, S	ACA AGC CTG TAG CCC ACG	428	RT-PCR
TNF-α, AS	TCC AAA GTA GAC CTG CCC		RT-PCR
ICAM-1, S	TCG GAG GAT CAC AAA CGA AGC	471	RT-PCR
ICAM-1, AS	AAC ATA AGA GGC TGC CAT CAC G		RT-PCR
fibronectina, S	GCA ACG TGT TAT GAC GAT GG	253	RT-PCR
fibronectina, AS	CTA ACG GCATGA AGC ACT CA		RT-PCR
G3PDH, S	TGA AGGTCG GTG TGA ACG GAT TTG GC	983	RT-PCR
G3PDH, AS	CATGTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC		RT-PCR

bp: pares de bases; S: sentido; AS: antisentido

La amplificación fue realizada empleando 25 μ L de la mezcla de reacción a 94°C por 15–60 s, 50–68°C for 30–60 s, y 72°C por 45–90 s con 28 ciclos para IL-1 β y 35 ciclos para los otros genes. Luego de la amplificación, se tomó 10 μ L de la de PCR y se analizó en un gel de agarosa al 1.5% mediante la técnica de electroforesis. Las bandas se visualizaron empleando el colorante GelRed™ solution (Biotium). Las intensidades se normalizaron comparando la expresión del gen con el gen constitutivo, G3PDH y representados como índice relativo.

2.14.4. Geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa fue utilizada para la visualización y separación de los fragmentos obtenidos por: extracción de ADN, de ARN, de plásmidos, ensayos de restricción ó amplificación de fragmentos. Generalmente se utilizó la agarosa entre 0,8 a 1,5% dependiendo en cada caso del tamaño esperado, conteniendo Gel red (Biotum) al 1%.

2.15. Medición de la concentración de nitritos en la línea celular RAW 264.7.

Las células RAW 264.7 fueron crecidas en placas de 96-pocillos y crecidas a un 80% de confluencia. El medio fue remplazado con medio fresco sin suero, y se estimularon las células con 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS de *Pseudomonas aeruginosa* LPS (Sigma, USA). Se incubaron los compuestos, dos horas antes de la incubación con LPS a las siguientes dosis: 12.5, 25 o 50 $\mu\text{g/ml}$ of RETOH o 3.125, 6.25, 12.5 or 25 $\mu\text{g/ml}$ of CA o CS. La viabilidad celular fue asegurada por empleando el colorante azul tripan. La acumulación de nitritos en los sobrenadantes de las células RAW 264.7 se midió utilizando el método de Griess (Yoon et al 2009). Se tomaron 50 μl of 1% sulfanilamida disuelta en 5% de ácido fosfórico y and 50 μl of 0.1% N-(1-naftil)-etilenediamina en agua y se agregó 50 de medio de cultivo. Luego de 10 min. de incubación a temperatura ambiente es midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro. Para calcular la concentración de nitritos se empleó una curva estándar realizada con nitrito de sodio como compuesto de referencia.

2.16. Análisis histológico.

Para el estudio histopatológico se tomaron muestras tratadas o no con los compuestos en estudio. Las mismas se fijaron toda la noche con 4% de formaldehído, y se procesaron para su posterior análisis por los métodos estándares, y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). El análisis semicuantitativo bajo microscopía óptica fue realizado por un médico patólogo.

2.17. Ensayo de adhesión bacteriana sobre células Calu-3.

Las células Calu-3, fueron utilizadas dado a las características que presenta esta línea celular: son tipo serosas con alta resistencia ($1,000\text{--}2,000 \text{ V}\cdot\text{cm}^2$), crece a confluencia, y las células expresan un CFTR funcional en cantidad en la parte apical de la célula (Illek et al 1996), formando unions fuertes o "tight junctions", quedando polarizadas y el CFTR del lado apical (Shen et al 1994). Estas células fueron mantenidas en medio Eagle-Dulbecco modificado (Sigma, St. Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (University of California, San Francisco Cell Culture) en una atmósfera húmeda con 5% CO_2 -95%. Las células se crecieron a 80% de confluencia y se tripsinizaron con una solución de 0.25% tripsina-0.1% EGTA por 5–15 minutos y pasó 1:5 de la dilución que contenía las células y la suspensión remanente se sembró directamente sobre una placa de 24 pocillos a una densidad de 10^6 cells/ cm^2 . Las células se dejaron crecer en pequeñas islas para investigar la adhesión a los bordes libres de la monocapa hasta la realización del ensayo.

La bacteria empleada para el estudio fue *P. aeruginosa* PAO1 que lleva el gen que codifica para la verde fluorescente GFP (Bloemberg et al 1997) y se mantuvo en medio LB-agar hasta su uso. Cuando se llevó a cabo el experimento, previamente se creció a PAO1 en LB líquido a 37°C a 200 rpm durante toda la noche se centrifugó, para eliminar el sobrenadante y se resuspendió a una OD de 0,1 (OD 600 nm) incubándose con xilitol a la dosis indicada.

Luego de que se incubó durante toda la noche a 37°C y 200 rpm, se lavó la bacteria en medio Ringer (NaCl 135 mM; MgSO₄ 1.2 mM; CaCl₂ 2 mM CaCl₂ 2 mM; K₂HPO₄ 2.4 mM; KH₂PO₄ 0.6 mM; Hepes 20 mM; Glucosa 10 mM) dos veces, resuspendiéndose el precipitado a una concentración final estandarizada de 10⁸ unidades formadoras de colonia (cfu)/ml equivalente a 0.1 absorbancia, 650 nm. Las células PAO1-GFP tratadas o no con xilitol se inocularon a una concentración de 10⁸ cfu/ml y se dejó durante 1 h a 37°C en estufa de cultivo, para permitir la adhesión a las células Calu-3. Luego de 1 h se lavó el cultivo con *P. aeruginosa* para eliminar la bacteria débilmente unida. La adhesión se visualizó por microscopía de fluorescencia (Nikon) (Lee et al 1999) de 10 campos por muestra. Los datos se procesaron con el programa ImageJ 1.42.

2.18. Ensayo de toxicidad MTS

Con el objeto de estudiar el efecto del sobrenadante de PAO1 sobre la actividad metabólica de las dos líneas celulares se realizó el ensayo de toxicidad MTS (sal del tetrazolio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio). Este ensayo está basado en la conversión de una sal de tetrazolio por enzimas celulares en un producto que es soluble en el medio de cultivo conocido como formazan. Esta conversión es producida por la NADH (forma reducida del dinucleótido nicotinamida adenina) producido por la deshidrogenasa en células metabólicamente activas. Las células Calu-3 se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 100000 células por pocillo. Se incubaron durante 24 horas antes del ensayo. Al otro día se aspiró el medio y se sustituyó por el sobrenadante de PAO1 a distintos porcentajes, y previamente filtrado. Las células se incubaron con las muestras durante 4 horas, tras las cuales se aspiraron y se sustituyeron por 100 µL de medio de cultivo. Se añadieron 20 µL del reactivo MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution) a los pocillos y, tras incubar las células durante 1 hora, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de placas. Los experimentos se realizaron por cuadruplicado y los resultados se analizaron por ANOVA de una vía. El porcentaje de actividad metabólica (AM) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$AM (\%) = (A_{muestra}/A_{medio de cultivo}) 100$$

donde la *A* muestra es la absorbancia de la muestra problema.

La morfología de las células Calu-3 se visualizó por microscopía empleando un microscopio Olympus BX51.

2.19. Medición de mediadores inflamatorios en Calu3

2.19.1. Medición de nitritos

Las células Calu-3 fueron crecidas en placas de 96-pocillos y crecidas a confluencia en DMEM suplementada con aminoácidos esenciales. El medio fue remplazado con medio fresco, y se estimularon con sobrenadante (0-50%) proveniente de un cultivo de PAO1 tratado o no con xilitol al 7%. La acumulación de nitritos en los sobrenadantes de las células se midieron

luego de 4 h de incubación con el sobrenadante de PAO1 utilizando el método de Griess (Yoon et al 2009). Para ello se tomaron 50 μ l de sobrenadante de cultivo y se agregó a una solución conteniendo 50 μ l de 1% sulfanilamida disuelta en 5% de ácido fosfórico y 50 μ l de 0.1% N-(1-naftil)-etilenediamina en agua. Luego de 10 min de incubación a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro. Para calcular la concentración de nitritos se empleó una curva estándar realizada con nitrito de sodio como referencia.

2.19.2. Especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) en Calu-3 mediante microscopía de fluorescencia

La presencia de ROS y RNS se realizó en las células Calu-3 mediante análisis por microscopía de fluorescencia, empleando diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) como reactivo, y como estímulo inflamatorio sobrenadante proveniente de un cultivo de PAO1 tratado o no con xilitol al 7%. Brevemente, las células Calu-3, crecidas a confluencia, fueron tratadas por 10 minutos con H₂DCFDA, removiéndose el exceso del mismo con PBS. Posteriormente, el sobrenadante de PAO1 se agregó al medio de cultivo de las Calu-3 en el rango de 0 a 50%. La presencia de ROS y RNS fue registrada en un microscopio Olympus BX51 con una excitación a 460–480 nm y emisión a 495–540 nm, en un período no mayor a los 30 minutos de exposición al agente inflamatorio. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Olympus DP72 digital y el software Olympus DP2-BSW. La fluorescencia obtenida se analizó empleando el software ImageJ 1.42. Las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia (excitación 460–480 nm y emission at 495–540 nm).

2.20. Medición de IL-8

Luego de hallar la concentración efectiva de trabajo, se incubó con los sobrenadantes bacterianos provenientes de cultivos con xilitol 7%. Las muestras se incubaron hasta 4 horas, se colectaron los sobrenadante del cultivo celular, se centrifugaron a 4000 rpm y se midió la liberación del marcador pro-inflamatorio interleuquina 8 (IL-8). La determinación de la secreción de la IL-8 al medio de cultivo se realizó utilizando ensayos comerciales inmunoenzimáticos (ELISA, Quantikine, R&D systems) siguiendo el protocolo del fabricante.

2.21. Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como la media de \pm SEM de n experimentos. Para el análisis estadístico se empleó el test ANOVA para hallar diferencias significativas. Seguidamente la diferencia significativa entre tratamientos se determinó por test de Tukey. Las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas con un $p < 0.05$.

CAPÍTULO III

3. Estudio de *Rosmarinus officinalis* y compuestos aislados de esta planta sobre *P. aeruginosa* PAO1

En esta primera parte del capítulo se presentan los resultados experimentales de los efectos obtenidos con dos extractos, uno acuoso (RACU) y otro etanólico (RETOH), proveniente de hojas frescas de romero y de sus compuestos fenólicos mayoritarios: el ácido carnósico (CA), el carnosol (CS) y el ácido rosmarínico (RA) sobre *P. aeruginosa* PAO1 (Holloway 1955). Posteriormente, se muestra la acción de los mismos sobre aislamientos clínicos provenientes de pacientes con FQ.

Los resultados previos, obtenidos en nuestro laboratorio, demostraron que el romero exhibía actividad antimicrobiana frente a cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Xanthomonas campestris* pv *campestris*) en el rango de 2-15 µg/ml y 2-60 µg/ml, respectivamente (Moreno S 2006). Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CIM) obtenidas, presentaban una buena correlación con la CIM para los compuestos puros como el CA y RA presentes en el extracto metanólico y acuoso, respectivamente (Moreno S 2006), indicando que la eficacia antimicrobiana de los extractos de romero se asociaba a su composición fenólica específica.

Según antecedentes bibliográficos sobre la medicina tradicional, las aplicaciones y usos del romero han estado relacionadas al tratamiento de las diversas patologías como por ejemplo, las afecciones respiratorias (al-Sereiti et al 1999, Erenmemisoglu A 1997, Oluwatuyi et al 2004). Debido a ello, se decidió ahondar más en el conocimiento que hasta entonces se tenía de los extractos de romero (RE) y sus compuestos fenólicos, sobre *P. aeruginosa*, dado que esta bacteria afecta las vías respiratorias de individuos diagnosticados con FQ, y está netamente relacionada con el deterioro pulmonar progresivo en estos pacientes. Para ello se abordó el estudio mediante las siguientes tareas:

- Como primer paso se obtuvieron los extractos RETOH y el RACU de hojas frescas de romero, mediante la utilización de un extractor Soxhlet.
- Seguidamente, se determinó la composición fenólica de los extractos, mediante la utilización de un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC (del inglés *High Pressure Liquid Chromatography*), equipado con una columna de fase reversa C-18 (HPLC/C-18) y empleando estándares comerciales de CA, CS y RA.
- Una vez obtenidos los perfiles de la cromatografía líquida y el perfil de la composición fenólica de cada uno de los extractos, se llevaron a cabo estudios de efectividad de estos y de los compuestos puros aislados de romero sobre *P. aeruginosa* PAO1 y se analizaron los resultados obtenidos.

3.1. Preparación y análisis por HPLC de los extractos de romero

Para la obtención de los extractos de romero (RE), se empleó un extractor Soxhlet cuyos componentes y estructura se presenta en la Figura 1.1. La técnica de extracción consiste, básicamente, en el pasaje sucesivo de un solvente sobre una muestra sólida a fin de extraer de ella componentes cuya solubilidad en el solvente es muy baja. En el laboratorio se realizaron extracciones etanólicas y acuosas a partir de plantas de romero proveniente de la provincia de San Luis, de la República Argentina. Las hojas fueron retiradas del tallo y se colocaron sobre un filtro de papel ubicado dentro del tubo de extracción. En el balón se colocó el solvente (etanol o agua), el que fue sometido a la temperatura de evaporación de cada solvente, con el fin de generar un reflujo continuo a través del sólido y de esta manera obtener los componentes concentrados.

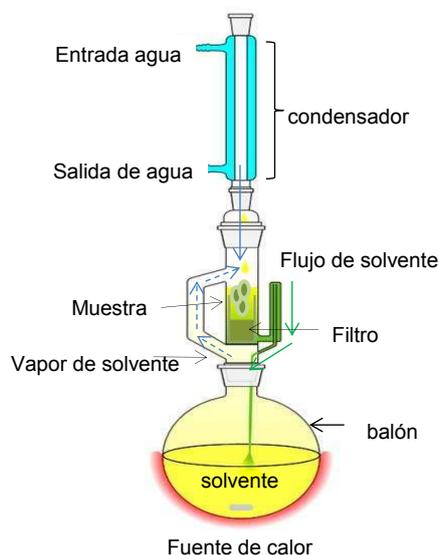


Figura 3.1. Esquema representativo de un equipo Soxhlet. La figura representa un equipo Soxhlet donde se señala el flujo del solvente empleado para la extracción de compuestos. El flujo se evapora y llega hasta el condensador, donde regresa en forma de líquido impregnando la muestra sólida contenida en el filtro de papel, y retorna al balón arrastrando los compuestos de interés.

Luego de la extracción, se procedió a la remoción del solvente utilizando un rotavapor, para concentrar la muestra obtenida en el balón. La composición fenólica en ambos extractos, se determinó por HPLC, empleando los estándares comerciales de CA, RA y CS (Alexia) (Figura 1.2.A y B). Los perfiles cromatográficos obtenidos para el RETOH y RACU se presentan en la Figura 3.2.C y D, donde se señala la presencia de CA, RA y CS determinados por el tiempo de retención o RT (RT, del inglés *Retention Time*), obtenido a partir de los estándares. Como se esperaba el RETOH, estaba enriquecido de CA y en menor medida de CS (Figura 3.2.B). RA no fue detectado en el RETOH, mientras que fue el compuesto mayoritario en el RACU junto

con otros compuestos minoritarios no identificados (Figura 3.2.C). Estos perfiles coinciden con los obtenidos por otros autores (Romo Vaquero et al 2012) y con los descriptos previamente (Moreno S 2006).

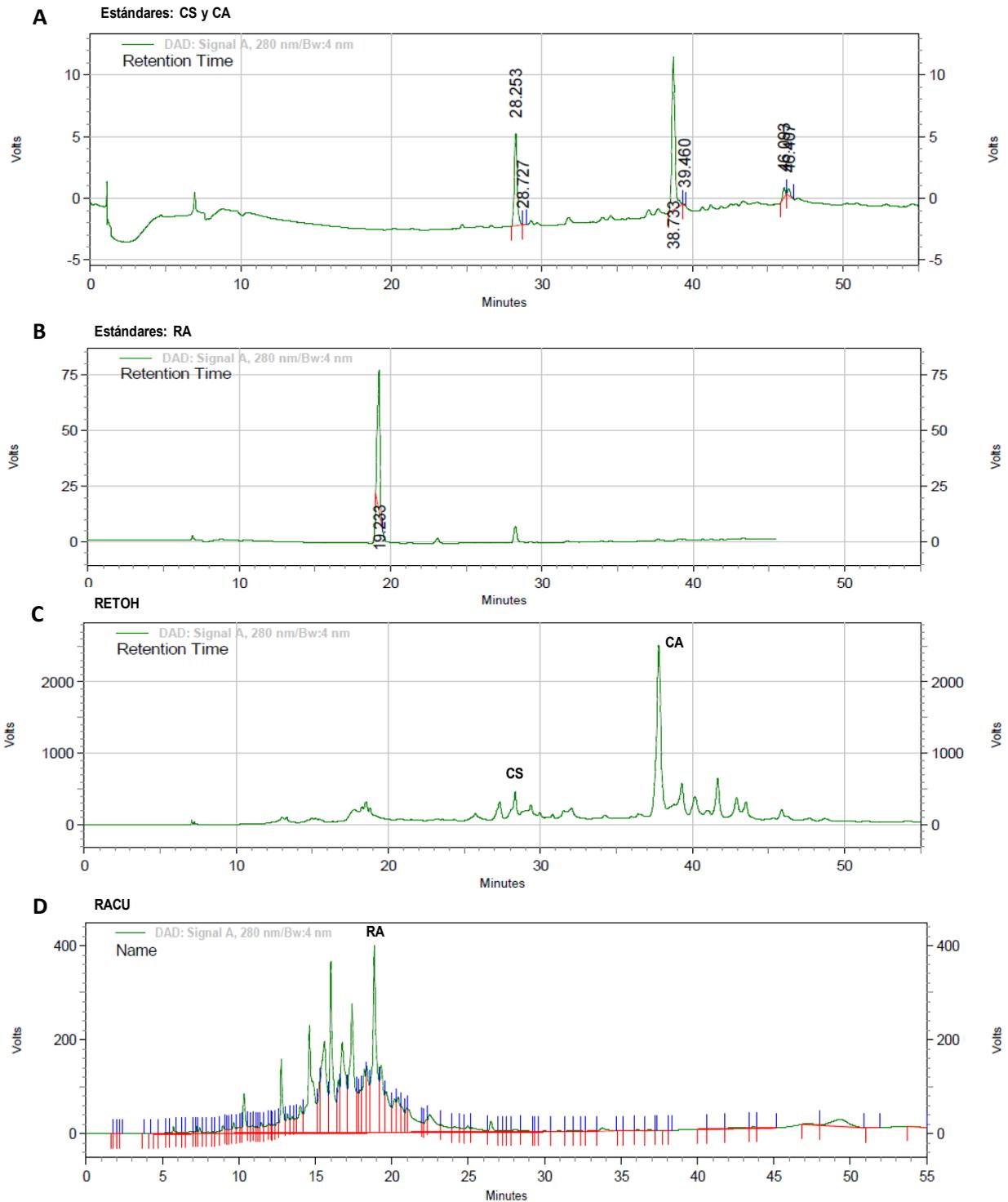


Figura 3.2. Cromatogramas obtenidos por la técnica de cromatografía líquida de alta presión, de los extractos de romero y sus respectivos estándares. Ácido carnósico (CA), carnosol (CS), (A); ácido rosmarínico (RA), (B). Los picos 19; 28,2 y 38,7; corresponden al tiempo de retención de corresponden al RA, CS y CA respectivamente. RETOH (extracto etanólico), C; RACU (extracto acuoso), (D).

3.2. Análisis sobre los efectos de los extractos de hojas frescas de romero.

3.2.1. Ensayo sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1.

Para estudiar si los extractos de romero RETOH y RACU presentaban acción antimicrobiana sobre la cepa PAO1 se empleó el método de macrodilución. Durante el ensayo se utilizó medio Müller Hinton ajustado con cationes (MHCA), de acuerdo a como lo establece el CCLS (Comité para los estándares clínicos de laboratorio) (CLSS 2001). Previamente la bacteria se creció en LB, se centrifugó y se diluyó a una densidad óptica (D.O.) de 0,01 a 600 nm en medio MHCA (Zampini et al 2005) junto con RETOH o RACU en el rango de 0 a 5 mg/ml. El crecimiento se registró por espectrofotometría a distintos tiempos. Como controles internos (blancos) se empleó MHCA más los extractos sin la bacteria.

Los resultados que se obtuvieron para el extracto RACU (Figura 3.3 A) demostraron que no posee actividad antimicrobiana a las dosis evaluadas porque las bacterias en su presencia alcanzaron los mismos valores que el control (sin extracto). En cambio RETOH (Figura 3.3.A), afectó el crecimiento de manera dosis dependiente y la CIM se logró a 1000 µg/ml dosis a la cual el crecimiento quedó completamente inhibido. Estos resultados coinciden con los publicados por Alnamer y col (Alnamer 2013) en la que demuestran por otro método, el de difusión en disco, que el RETOH inhibe el crecimiento de *P. aeruginosa* (Alnamer 2013, Genena 2008).

A su vez, se extendió el análisis a los principales compuestos activos presentes en los extractos de romero, el CA, el CS y el RA empleando el método anterior. El RA, compuesto mayoritario en el RACU, tampoco fue efectivo en PAO1 a las concentraciones evaluadas ni a concentraciones superiores de 5 mg/ml (Figura 3.3.B). El crecimiento de la bacteria en presencia de RA coincidía con el control (sin RA). Mientras que, el CA y CS, fueron efectivos. La CIM para estos compuestos fue de 600 µg/ml y 800 µg/ml, respectivamente (Figura 3.3. C y D), indicando que el efecto inhibitorio observado con RETOH sobre PAO1 estaría dado por estos compuestos, ya que el RETOH extraído de las hojas frescas de romero se encuentra enriquecido principalmente en CA y en menor medida en CS (Figura 3.3.).

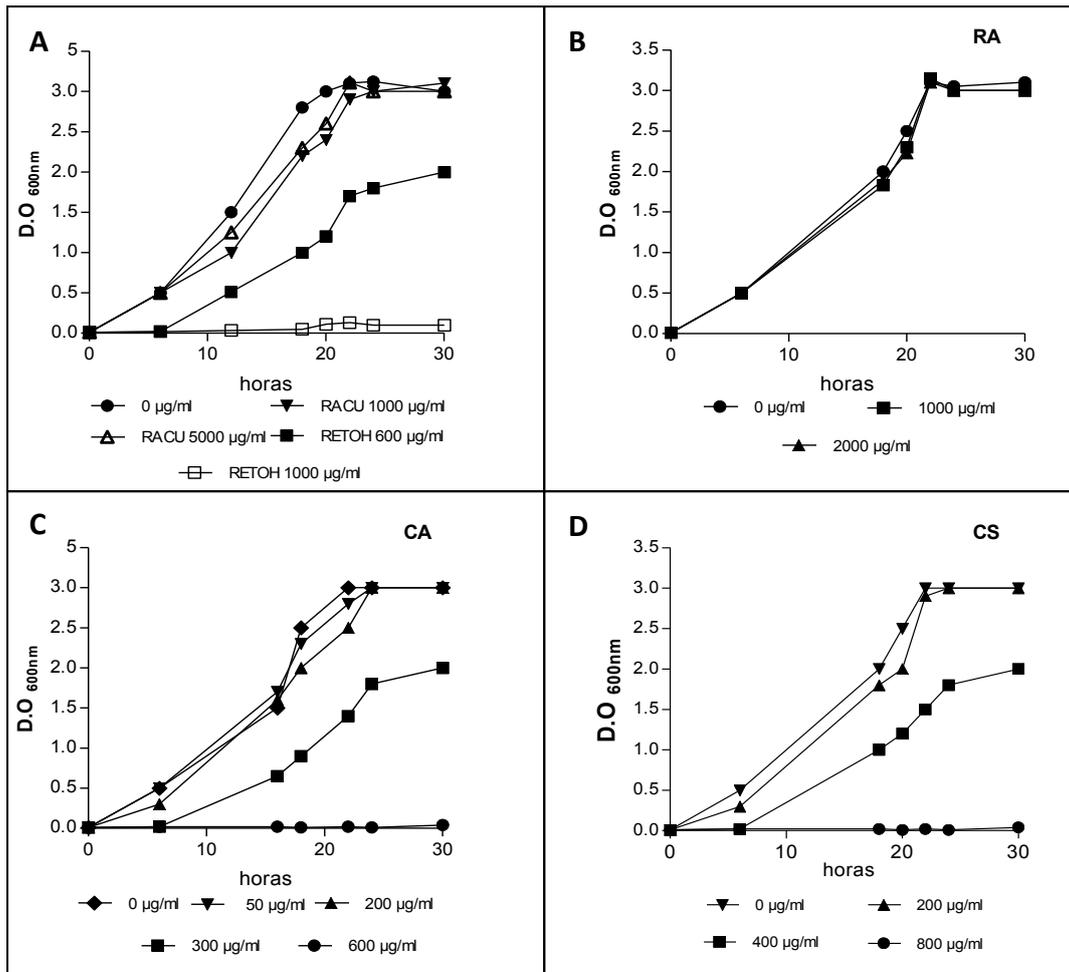


Figura 3.3. Efecto de los extractos de romero y de los compuestos bioactivos sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 en medio MHCA. RETOH (extracto etanólico) y RACU (extracto acuoso) (A); RA (ácido rosmarínico) (B); CA (ácido carnósico) (C); y CS (carnosol) (D). Los experimentos fueron realizados por triplicado, N=3. Los valores se expresan como \pm D.E.

3.2.2. Estudio del romero sobre aislamientos clínicos provenientes de pacientes con FQ.

A partir de estos resultados, se extendieron los ensayos sobre aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con FQ y sobre tres cepas que también se encuentran presentes en pacientes con FQ como *Stafilococcus aureus*, *Burkholderia cepacia* (II), y en menor medida *Escherichia. coli*. Se realizó una revisión de la resistencia a antibióticos de uso frecuente de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* y *B. cepacia* a través de un antibiograma de acuerdo al CLLS (CLSS 2001) empleando discos de gentamicina (GEN) 120 µg; tobramicina (TOB) 10 µg y ceftazidima (CAZ) 30 µg (Anderson et al 2012, CLSS 2001) y seguidamente se evaluó por el método de macrodilución en agar, el efecto de los extractos y los compuestos puros sobre dichos aislamientos. Este método se empleó a modo de proyectar a grandes

rasgos, la efectividad de los extractos y los compuestos puros sobre los aislados. Como control interno para los antibióticos se empleó la cepa de referencia *P. aeruginosa* ATCC27853. Los resultados que se obtuvieron luego de 20 h de incubación a 37°C y a partir de la inspección visual de las placas (Figura 3.4.) se presentan en la Tabla 3.1. Los valores hallados para los aislados clínicos de *Pseudomonas* se encontraron que las respuestas fueron variables en cuanto a la resistencia o susceptibilidad a los antibióticos; en dónde se observó que todas eran resistentes por lo menos a uno de los antibióticos estudiados. Sin embargo, todas fueron susceptibles en mayor o menor medida a RETOH y CA. El rango de susceptibilidad fue de 200 a 800 µg/ml para ambos compuestos. Lo más relevante durante este estudio fue que la cepa FQres, resistente a todos los antibióticos, mostró ser susceptible a RETOH y a CA. En el caso del RACU, todas las cepas crecieron en presencia de este extracto al igual que en presencia de su compuesto bioactivo RA, aún a altas dosis.

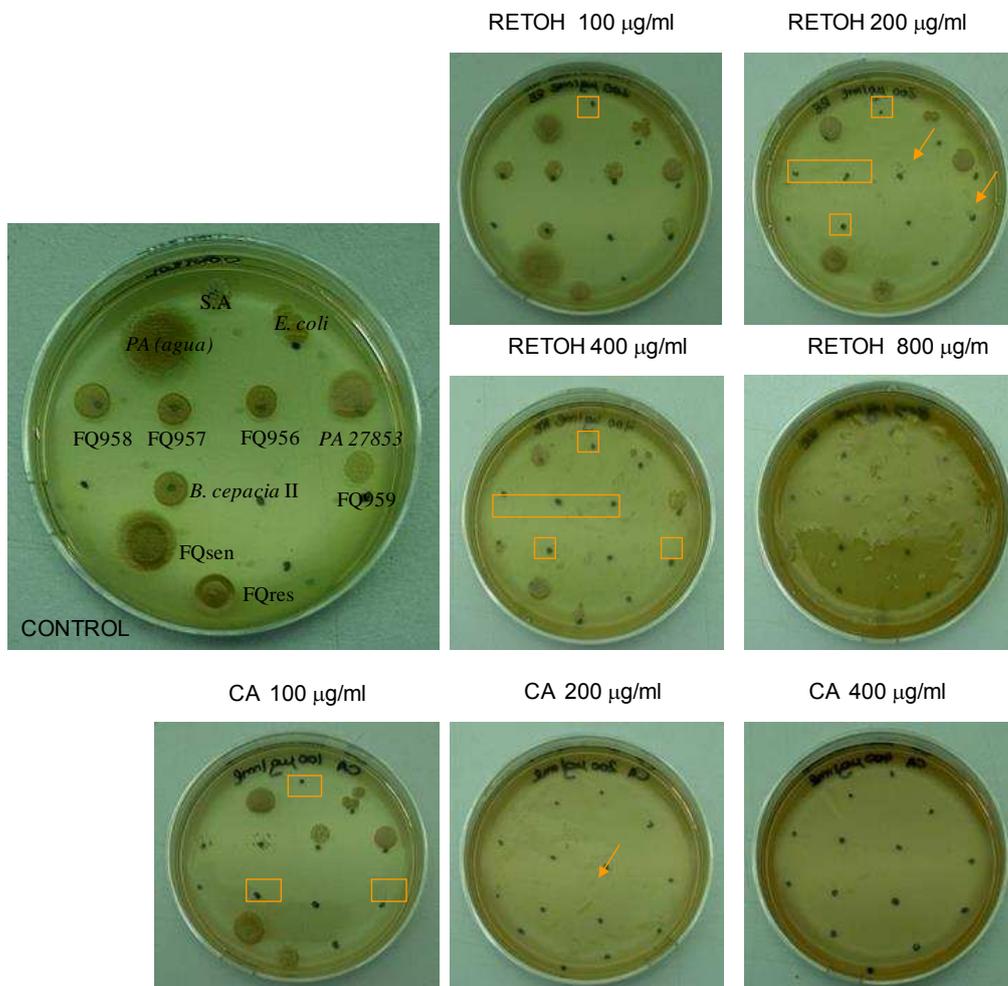


Tabla 3.1. Susceptibilidad a antimicrobianos y acción de los extractos de roemero y compuestos bioactivos sobre cepas bacterianas comunmente en pacientes con FQ

CEPA/Antibiótico	GEN	TOB	CAZ	RETOH	RACU	CA	RA
<i>P. aeruginosa</i> aislado de agua	S	S	S	800	>10000	200	>10000
956	R	S	R	800	>10000	400	>10000
957	R	S	R	600	>10000	600	>10000
958	R	S	R	600	>10000	600	>10000
959	R	S	R	800	>10000	400	>10000
Fqsen	R	S	S	1200	>10000	800	>10000
Fqres	R	R	R	1200	>10000	800	>10000
BII	R	S	S	200	>10000	100	>10000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	S	S	R	800	ND	200	ND
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	S	S	S	800	ND	200	ND
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	S	S	S	800	>10000	600	>10000

GEN: gentamicina 120 µg; TOB: tobramicina 10 µg; CAZ: ceftazidima 30 µg; RETOH (µg/ml): extracto etanólico; RACU (µg/ml): extracto acuoso; CA (µg/ml): ácido carnósico; RA (µg/ml): ácido rosmarínico; ND: No determinado.

Dado que el comportamiento de la mayoría de los aislamientos clínicos fue similar al de la cepa de referencia PAO1, los experimentos que describen a continuación se desarrollaron con PAO1.

3.2.3. El RETOH potencia la acción de los antibióticos a dosis subinhibitorias sobre PAO1 en forma planctónica.

Hoy en día se propone que la combinación de compuestos provenientes de fuentes naturales, como los que provienen de la dieta, en combinación con antibióticos, podría ser una buena estrategia para el tratamiento de infecciones causadas por especies bacterianas debido a que los productos naturales pueden potenciar la actividad de los antibióticos (Jayaraman et al 2010, Lewis & Ausubel 2006). Teniendo en cuenta este concepto, se investigó la viabilidad de PAO1 (D_{600nm} inicial=0,01) en presencia de RETOH (50 µg/ml) junto con distintas concentraciones de GEN, TOB y CAZ a dosis subinhibitorias. Luego de 20 h de cultivo se analizaron los resultados obtenidos para el crecimiento de PAO1 crecido de manera planctónica. Los datos obtenidos se graficaron como inhibición crecimiento (%) vs dosis de antibiótico empleado (Figura 3.5). Los gráficos revelaron que el crecimiento de PAO1 se redujo notablemente y de manera significativa para los tres antibióticos empleados al emplearlos junto con RETOH. Para la combinación de RETOH-GEN el crecimiento disminuyó conforme aumentaba se incrementaba la concentración del antibiótico. Por el contrario, el uso de GEN sólo logró tener efecto sobre el crecimiento cuando se emplearon dosis mayores de 1 µg/ml. Esto indica que RETOH potencia la acción de GEN a dosis bajas. Sin embargo, para ambos casos RETOH-GEN o GEN sólo se alcanzó una reducción en el 50% del crecimiento (EC_{50}) alrededor de a 1,75 µg/ml.

En cuanto a las curvas obtenidas para CAZ y TOB la EC_{50} se logró a 0,0625 $\mu\text{g/ml}$ manteniéndose el efecto inhibitorio hasta los 0,75 $\mu\text{g/ml}$ para la combinación de RETOH-CAZ y hasta 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para RETOH-TOB. La EC_{90} fue de 5 $\mu\text{g/ml}$ para RETOH-CAZ y de 1 $\mu\text{g/ml}$ para RETOH-TOB. Estos resultados indicarían que de todas las combinaciones la RETOH-TOB fue la más efectiva.

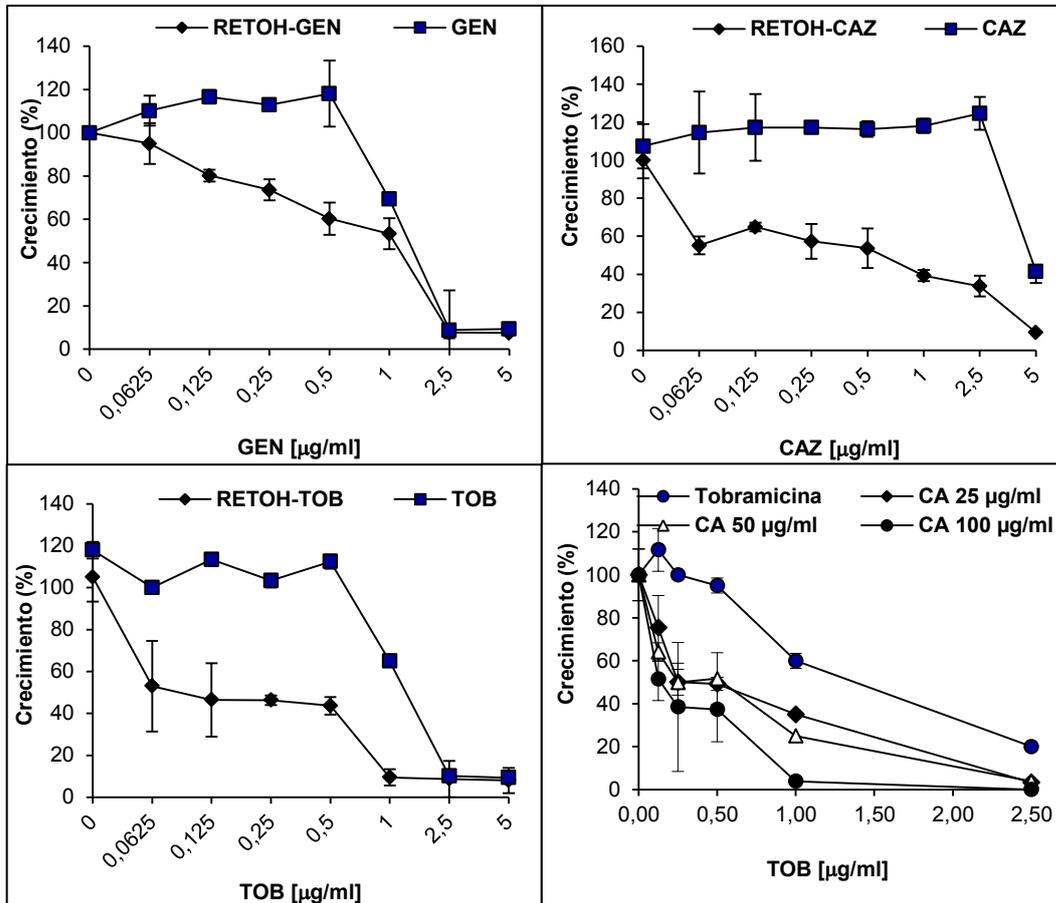


Figura 3.5. Interacción del RETOH y de CA con distintas concentraciones de GEN, TOB y CAZ sobre *P. aeruginosa* PAO1 cultivado en forma planctónica. Luego de 20 horas, se midió por densidad óptica (600 nm), el porcentaje de células presentes en el medio de cultivo. Los resultados se expresan como crecimiento (%) con respecto al control (media \pm D.S de cultivos por triplicados) vs. cantidad de antibiótico empleado [$\mu\text{g/ml}$]. Se muestra un ensayo representativo de 3 ensayos independientes, N=3.

El experimento anterior se repitió empleando CA y TOB, también en el rango de dosis subinhibitorias de crecimiento, combinando tres dosis por debajo de la CIM de CA (25, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$) junto con distintas concentraciones TOB (0-0,5 $\mu\text{g/ml}$). Con el antibiótico sólo, se obtuvo el mismo comportamiento observado anteriormente, en el que se reprodujo el perfil de crecimiento de la bacteria bajo tratamiento con TOB, es decir la viabilidad estuvo levemente incrementada con respecto al control (sin antibiótico) cayendo rápidamente luego de los 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Los valores de EC_{50} fueron de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ cuando se emplea CA a 25 $\mu\text{g/ml}$ o 50 $\mu\text{g/ml}$ y de 0,125 $\mu\text{g/ml}$ cuando se adiciona 100 $\mu\text{g/ml}$ de CA al cultivo. La inhibición completa se

alcanzó con CA a 100 $\mu\text{g/ml}$ + 1 $\mu\text{g/ml}$ de TOB, mientras que si se emplease el antibiótico sólo se lograría inhibir el crecimiento a dosis superiores de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3.5.). Los datos obtenidos demuestran que tanto el RETOH como el CA, son sustancias con capacidad potenciadora de los antibióticos a dosis en las cuales el antibiótico sólo no tiene ningún efecto sobre la bacteria.

3.3. Estudio del *biofilm* formado por *P. aeruginosa* en presencia de ácido carnósico.

3.3.1. El CA a bajas concentraciones afecta la formación de *biofilm* de PAO1.

Durante muchos años, las investigaciones sobre el efecto de los extractos de las plantas y sus componentes activos sobre cultivos bacterianos, se han centrado casi exclusivamente en la acción de estos sobre el crecimiento planctónico. Sin embargo, desde el conocimiento del impacto de los *biofilms* en la clínica, se ha buscado estudiar el efecto de diversos compuestos sobre la estructura y la estabilidad de los *biofilms*, a fin de aumentar la susceptibilidad antibiótica. Se sabe que bajo estas estructuras, los microorganismos son más difíciles de erradicar por lo que se lo considera el estadio bacteriano de más difícil control (Sandasi et al 2010). Estudios in vitro demostraron que su formación depende, entre otros factores, del estado nutricional en que se encuentren. Por lo general, los *biofilms* bacterianos se desarrollan en ambientes en los que hay escasa o baja disponibilidad de nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano.

Para evaluar la formación *biofilm* de PAO1 en presencia de CA, se realizó el ensayo empleando medio mínimo FAB suplementado con casaminoácidos (como fuente de carbono), en placas de Elisa de 96 pocillos y CA a las dosis indicadas. Previamente se determinó si el crecimiento en este medio junto con CA, afectaba la viabilidad bacteriana y no se obtuvieron diferencias entre los tratamientos y el control (PAO1 sin CA). Para el experimento se empleó un cultivo crecido durante toda la noche en LB, se centrifugó y se lo diluyó en medio mínimo a una D.O. 600 nm equivalente a 0,01, realizando el experimento por octuplicado. La determinación de *biofilm* se realizó con el colorante cristal violeta (CV) porque permite de manera indirecta cuantificar la biomasa de bacterias que permanecieron adheridas al sustrato (placa de poliestireno). Los resultados obtenidos de *biofilm* de cada uno de los pocillos se normalizaron con los valores de D.O correspondiente al crecimiento de la bacteria y se graficó CV/O.D vs [CA] (Figura 3.6). En función de los datos obtenidos, se determinó que CA afecta la formación del *biofilm* de PAO1 en un 25% con respecto al control ($p < 0.05$) y con resultados similares para las tres dosis CA indicando que el efecto es independiente de la concentración del compuesto utilizada. A su vez, se reprodujo el experimento sobre cepas de pacientes a fin de establecer si el CA también interfiere en la formación de *biofilm* de los aislamientos clínicos. Como se puede observar en la Figura 3.6. (B-E), en algunas cepas como en la 958 el *biofilm* se redujo hasta un 60% para 50 $\mu\text{g/ml}$ de CA. En el caso de la 959 la reducción de la formación del *biofilm* fue de 50% para CA=50 $\mu\text{g/ml}$ y de 34% para 100 $\mu\text{g/ml}$ de CA. El efecto de las distintas dosis de CA

sobre el *biofilm* de la cepa FQres como para la 956 no fue significativo con respecto al control. Estos resultados indicarían que el CA ejerce un efecto sobre la formación de *biofilms* dependiendo de las características particulares de cada cepa.

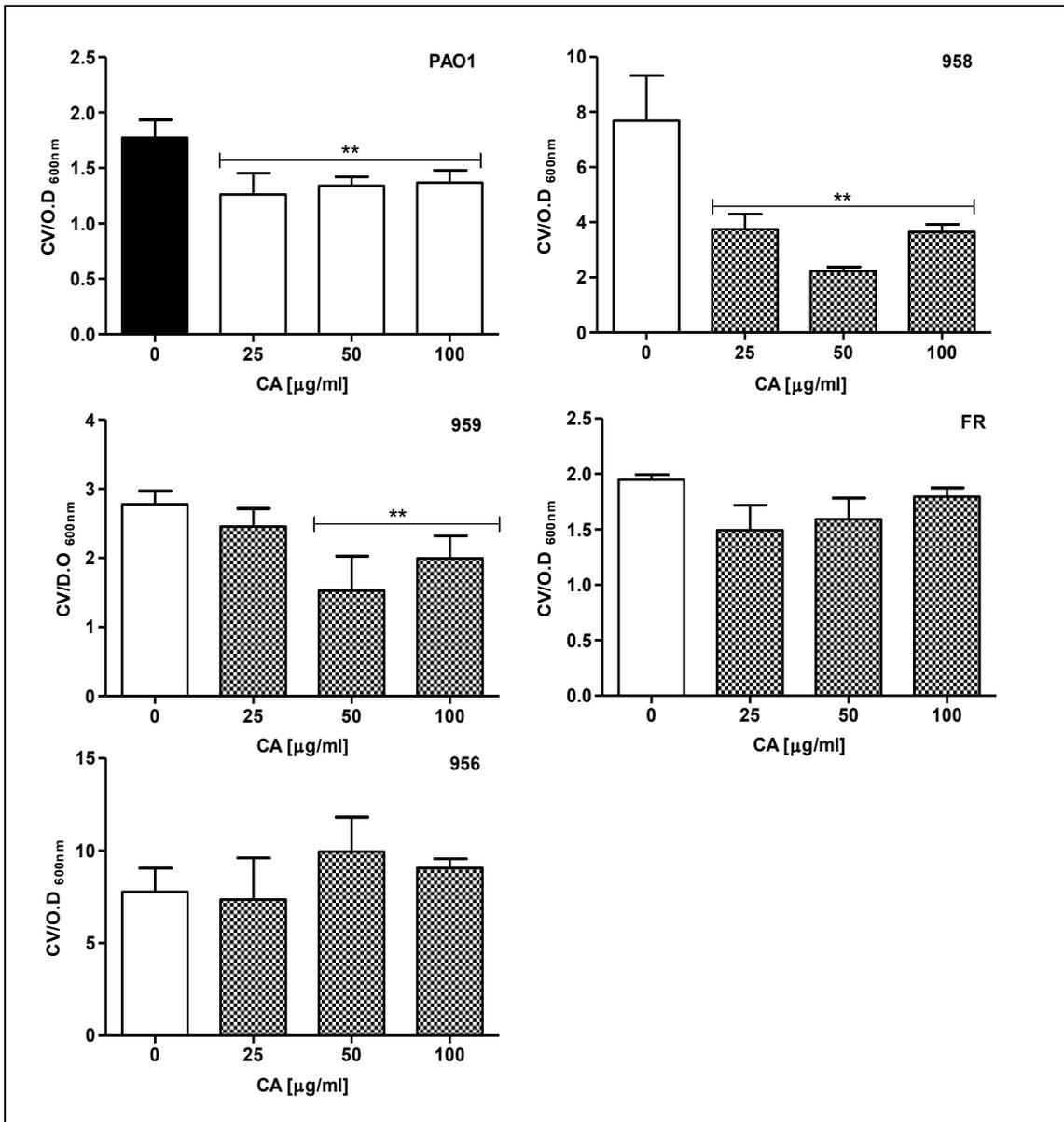


Figura 3.6. Formación de *biofilm* en presencia de distintas concentraciones de CA. Las bacterias (D.O.=0,01) fueron crecidas en presencia de CA en medio mínimo FAB + casaminoácidos durante 20 horas. La formación de *biofilm* se realizó empleando la técnica de tinción con cristal violeta. Los resultados se expresan como \pm D.E con ** $p < 0.05$ con respecto al control

Seguidamente y de acuerdo a datos bibliográficos en dónde otros grupos demuestran que compuestos derivados de las plantas pueden alterar la estructura del *biofilm* (Hentzer M 2002), se analizó si esta característica podía ejercerla también el CA y a su vez aumentar la susceptibilidad a TOB. El experimento se desarrolló de la siguiente manera: por un lado se crecieron las bacterias durante 20 h en medio mínimo FAB sólo o con CA (5 µg/ml). Al día siguiente se removió el cultivo y se agregó a un grupo medio fresco sólo, medio con CA (5 µg/ml) o medio con TOB (10 µg/ml), dejando la placa a 37°C por 24 horas más (Figura 3.7.). La cuantificación de *biofilm* se realizó de la misma manera descrita anteriormente, empleando CV y normalizando el valor obtenido con el crecimiento bacteriano.

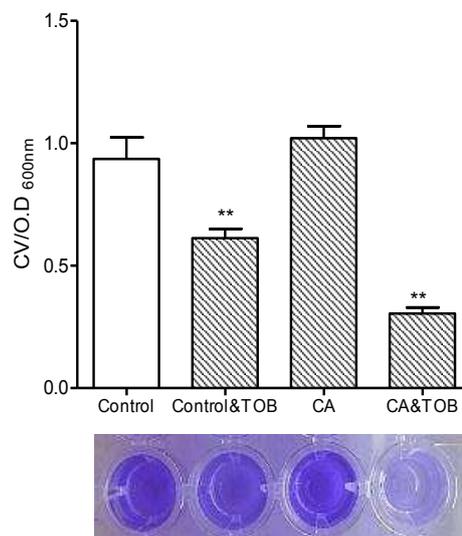


Figura 3.7. Determinación de la formación de *biofilm* mediante el ensayo de cristal violeta. Un cultivo de PAO1 se lo llevó a una OD=0.01 en medio FAB con 1% de casaminoácidos y se lo incubó bajo las condiciones descritas (a). Finalizado el experimento se cuantificó la formación de *biofilm* mediante tinción con cristal violeta. Los datos se expresan como la media ± D.E de cada una de las muestras *p <0,05, en comparación con el control(B). Inspección visual de las placas teñidas con el colorante (C).

En base a los datos, se encontró que no hubo diferencias significativas entre el *biofilm* formado por el control y la muestra incubada únicamente con CA Figura 3.7., sin embargo las diferencias presentadas para la muestra al que se adicionó TOB por 24 horas, redujo la biomasa en un 35% respecto al control y aquella en la que se combinó CA+TOB el biofilm disminuyó un 67,5%. Esto podría estar indicando que el *biofilm* formado en presencia de CA es estructuralmente distinto al control, permitiendo el acceso del antibiótico y por lo tanto facilitando la acción bactericida del mismo, por ello las diferencias encontradas.

3.4. EL CA afecta los movimientos de *swarming* y *twitching* pero no de *swimming* de *P. aeruginosa* PAO1.

En la bibliografía, existen varios artículos que describen la importancia de la motilidad bacteriana como paso previo para el desarrollo del *biofilm* sobre las distintas superficies (Verstraeten et al 2008); (O'Toole & Kolter 1998). Para que un microorganismo logre colonizar una superficie, el primer paso es acercarse, adherirse y lograr mantenerse adherido a ella. *P. aeruginosa* utiliza distintos apéndices como el flagelo y pili tipo IV, que cumplen la función de movimiento y adhesión (Nougayrede et al 2003, Pratt & Kolter 1998, Sauer et al 2002) permitiendo su desplazamiento y la colonización de diferentes sustratos. En sustratos acuosos, *P. aeruginosa* utiliza el flagelo para nadar (*swimming*) y dirigir su movimiento. Una vez unida a la superficie, comienza la expansión clonal de la bacteria, se hiperflagela y permite que la colonia migre de manera coordinada (*swarming*) (Takahashi et al 2008). Sobre superficies y estructuras sólidas, *P. aeruginosa* se desplaza empleando el *pilus* tipo IV, movimiento conocido como *twitching*.

Como la motilidad de *P. aeruginosa* es un factor importante y determinante en la virulencia bacteriana, ya que está involucrado en la formación de *biofilm* (Drake & Montie 1988), se decidió estudiar si adicionando CA al medio de crecimiento era capaz de inhibir alguno de los tres tipos de movimientos de la bacteria. Para ello se cultivó PAO1 en LB hasta fase estacionaria y se evaluó la motilidad en placas de Petri empleando distintos porcentajes de agar: 0,3% para *swimming*, 0,7% para *swarming* y 1,5 % para *twitching*, y distintas dosis de CA en FAB-casaminoácidos al 1%. Un volumen de 2µl se sembró en el centro de las placas para *swimming* y *swarming*, mientras que para *twitching* se empleó un palillo para atravesar la totalidad del agar hasta la base de la placa de Petri. Los resultados de cada uno de los ensayos fueron inspeccionados luego de 24 horas y 48 horas, como se menciona a continuación.

3.4.1. El CA inhibe el *swarming* pero no el *swimming*

Cuando se ensayó la motilidad de *swarming*, se observó tanto en presencia como en ausencia de CA, la colonia desarrollo un movimiento con bordes irregulares, similares a dendritas emergiendo desde el punto de inoculación hacia la periferia (Figura 3.8.A). Este fenotipo presentado por la colonia en la placa de agar, es característico de este movimiento y el patrón obtenido concuerda con el de otros grupos (Lindhout et al 2009). Sin embargo, al momento de evaluar las placas que contenían CA en el rango de 0-10 µg/ml, el movimiento de *swarming* estuvo marcadamente reducido. Las colonias desarrolladas mostraron bordes completamente planos observándose en el punto de inoculación mayor biomasa bacteriana, comparada con el control, debido a que en esta última las bacterias se encontraban más dispersas por toda la placa (Figura 3.8.B-D). Esto indicaría que las bacterias permanecen retenidas en el punto de inoculación y que el CA impediría el desplazamiento hacia la periferia. Este fenómeno se analizó durante 24 y 48 horas obteniéndose siempre los mismos resultados.

En cuanto al *swimming*, el CA no logró inhibir este movimiento permitiendo el desplazamiento de la bacteria a las dosis ensayadas.

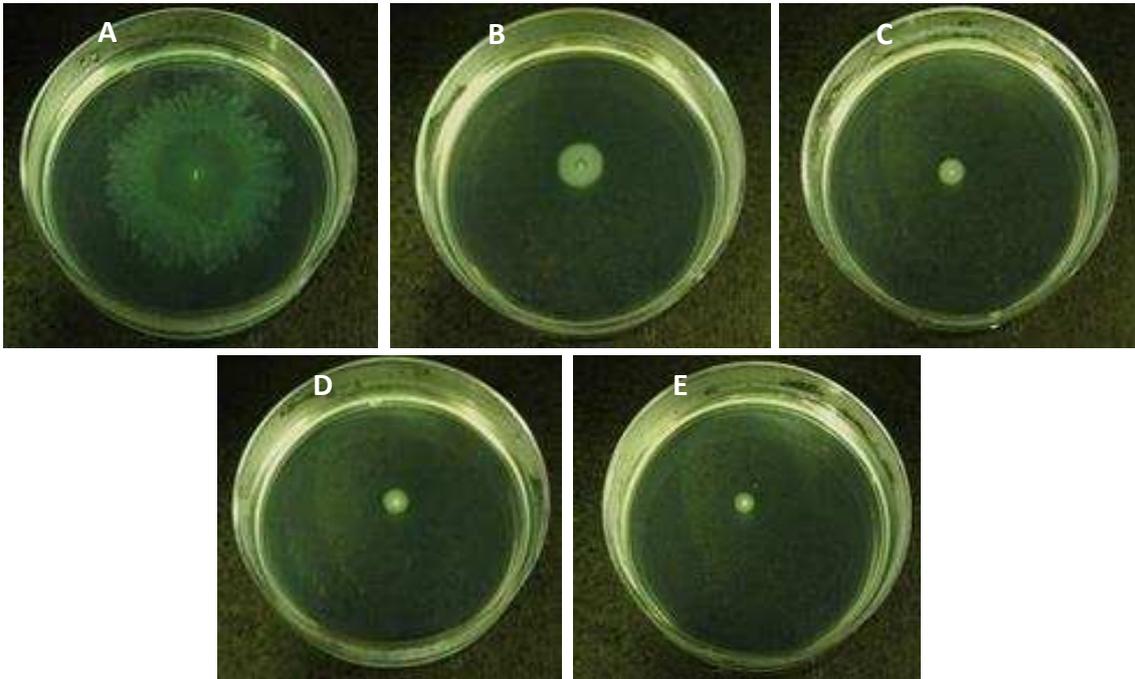


Figura 3.8. Ensayo de movilidad “swarming” de PAO1 en presencia de ácido carnósico (CA) a distintas concentraciones en medio mínimo suplementado con casaminoácidos al 1%. (A) Control (B), 1 µg/ml (C), 5 µg/ml(D), 10 µg/ml (d), 20 µg/ml (E). Las placas se mantuvieron a 30°C durante 24 h y observadas durante 48 h más obteniendo los mismos resultados.

Las bacterias que realizan *swarming* están localizadas exclusivamente en la periferia de la colonia donde se forma un *biofilm* delgado móvil que avanza conforme la masa celular está en crecimiento y a medida que la biomasa de la colonia aumenta, la población celular coloniza la superficie disponible (Rasmussen et al 2000). Debido a ello, se evaluó si las bacterias que se encontraban bajo el movimiento de *swarming* podían ser repelidas por CA inoculado como un punto sobre la placa. Para estudiar esta hipótesis se impregnaron discos de papel con 0,2; 0,5 y 1 µl de CA (4 mg/ml), y se los dejaron en condiciones de esterilidad hasta la evaporación del solvente. Posteriormente se los ubicó sobre la placa de *swarming* y se aplicó 2 µl de un cultivo de PAO1 en el centro de la placa (Figura 3.9.Aa). Pasadas las 6 h se inspeccionaron las placas observándose crecimiento de la colonia. Luego de 16 horas (Figura 3.9.Ab), PAO1 comenzaba a realizaba el movimiento característico de *swarming* hacia todas las direcciones y sobre los discos que contenían únicamente el solvente, es decir dónde se diluyó la droga (control). Claramente la bacteria se desplazaba libremente por encima del disco de papel (Figura 3.9.Ab). En cambio, en la placa que contenía los discos impregnados con CA, las bacterias cambiaron la trayectoria de desplazamiento alrededor del disco sin tocarlo (Figura 3.9.Ac). Esto se observó también a las 24 horas (Figura 3.9.Ac). A modo de magnificar el punto de inoculación, en la Figura 3.9.B se puede ver como la colonia bacteriana toca el disco control que lleva el

solvente, mientras que en los discos con CA, PAO1 se desplaza hacia los costados de los filtros rodeándolos (Figura 3.9. B, b-d) y depende de la concentración de CA que está contenida en el filtro, ya que la colonia se desplaza a distancias más lejanas del punto donde se encuentra el filtro a medida que aumenta la dosis de CA.

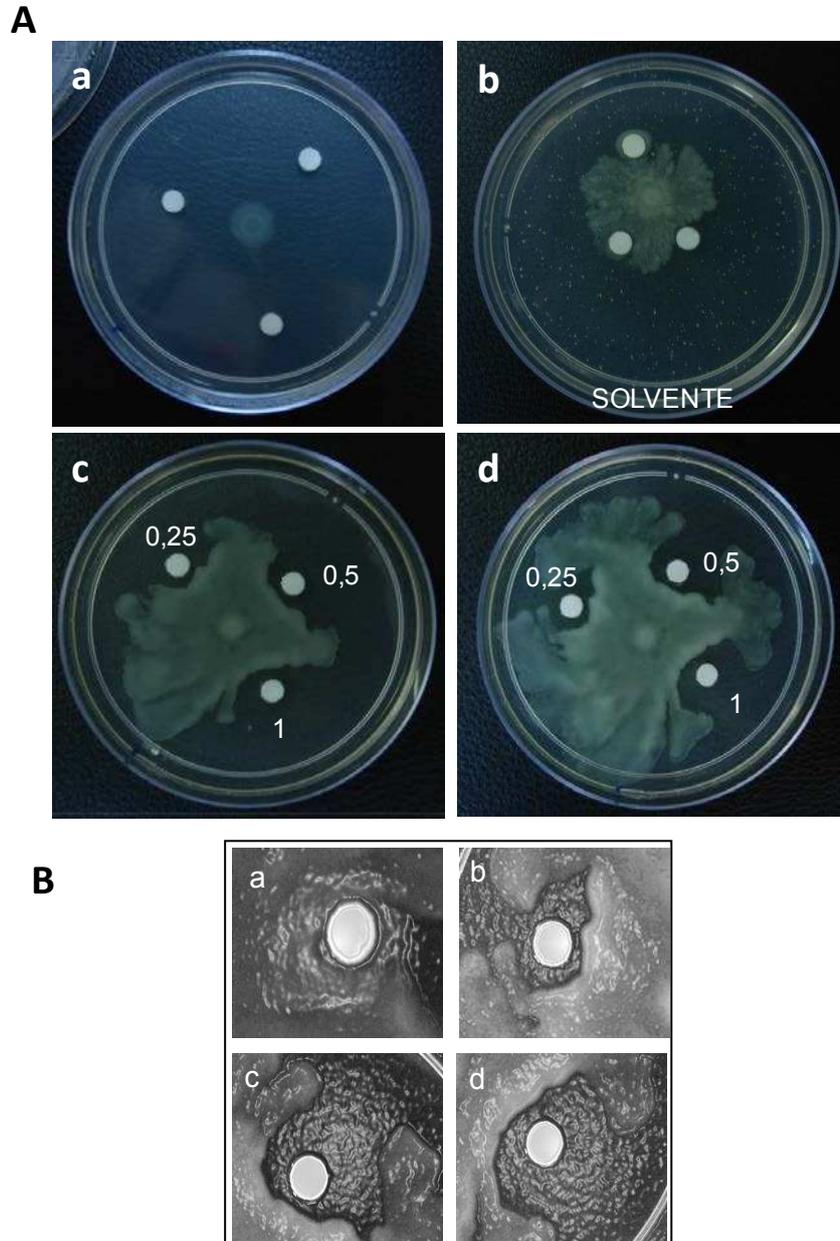


Figura 3.9. Imágenes representativas de la motilidad de *swarming* sobre placas conteniendo discos de papel impregnados con CA. Los discos fueron impregnados con CA (μl) a partir de una solución madre de 4 mg/ml y ubicados sobre la placa una vez que se evaporó el solvente. Las placas se inspeccionaron a distintos tiempos (A) 6 horas (b); 16 h placa control (c); placa con los distintos tratamientos a las 20 y (D) 24 h. (B) Imágenes ampliadas y procesadas con ImageJ luego de 24 h de: (a) control, y (b) 0,25, (c) 0,5 μl y (d) 1 μl de CA (4 mg/ml). Las placas se mantuvieron siempre a 30°C para permitir el desarrollo de la motilidad.

3.4.2. El *twitching* de PAO1 es inhibido por CA de manera dosis dependiente

El *twitching* es otro de los movimientos que realiza *P. aeruginosa* y puede ser llevado a cabo por la bacteria tanto en superficies orgánicas como inorgánicas, incluyendo geles de agar, células epiteliales, plásticos, vidrio y metales. La motilidad de *twitching* es requerida, entre otras funciones, para la colonización del hospedador y la patogénesis, incluyendo la activación de la respuesta inmune (Merz & So 2000). Como el *twitching* también cumple un rol importante en la infección, se decidió valorar el efecto del CA sobre este tipo de desplazamiento en PAO1. La cepa PAO1 fue inoculada en placas de agar conteniendo medio mínimo y distintas concentraciones de CA, en el rango de 0-10 $\mu\text{g/ml}$. Luego de 20 h de incubación y como se describe en Materiales y Métodos, se empleó el método de tinción con azul brillante de Coomassie ya que permite visualizar el halo formado por el desplazamiento de la bacteria ocurrido entre la superficie del agar y la placa. En la Figura 3.10., se observa como el control, es decir la cepa PAO1 sin CA, desarrolló el movimiento de *twitching* en donde el halo se desarrolló alrededor del punto de inoculación. Únicamente en las placas que contenían CA a 0.5 $\mu\text{g/ml}$ presentaron un halo de menor tamaño y una apariencia más traslúcida si se lo compara con la placa control y aquellas que tenían una dosis mayor de CA (1 a 10 $\mu\text{g/ml}$) no se pudo visualizar el halo característico asumiendo que a dosis mayores el *twitching* está reprimido (Figura 3.10.A).

De acuerdo a los datos bibliográficos, en medio mínimo, las colonias de *P. aeruginosa*, se esparcen con apariencia rugosa y dispersa a medida que la bacteria va emergiendo desde la periferia y puede ser variable dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo. (Mattick et al 1996; Semmler et al 1999). Para verificar este dato se observaron los bordes generados empleando un microscópico óptico. En el control se determinó que las bacterias de los bordes, se encontraban ampliamente esparcidas otorgando una apariencia irregular a la colonia y dando idea de movimiento y colonización de nuevas superficies (Figura 3.10.Ba), mientras que los bordes desarrollados por las bacterias crecidas en presencia de CA, los bordes eran suaves y regulares (Figura 3.10.B, b-c), sin hallarse bacterias dispersas por fuera de los límites de la colonia. Este resultado complementado con el anterior confirma que el CA afecta el movimiento de *twitching* en PAO1.

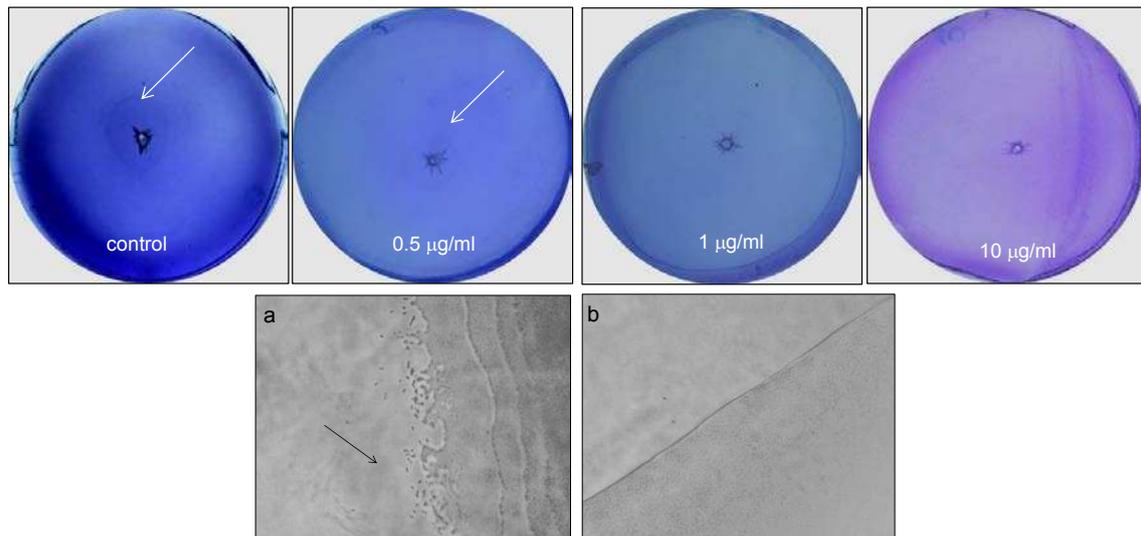


Figura 3.10. Ensayo de motilidad “*twitching*” de PAO1 en presencia de concentraciones crecientes de CA, en medio mínimo suplementado con casaminoácidos (0.5%), incubada a 37°C. Las placas fueron teñidas con azul de coomassie y decoloradas con acetato de etilo para visualizar la zona de *twitching*. (A) Visualización al microscopio óptico de los halos de *twitching*. control (a); en presencia de 1 µg/ml (b); 10 µg/ml (c). La flecha muestra bacterias expandiéndose sobre la superficie.

El *swimming*, el *swarming* y el *twitching* también fueron evaluados en presencia de los compuestos bioactivos como el RA y CS. El rango de dosis ensayada fue la misma que la de CA. Sin embargo, con RA ninguno de los tres movimientos fueron inhibidos, indicando que este compuesto no tiene efectividad sobre PAO1, pero sí el CS dónde el *swarming* fue reprimido. Con respecto al *twitching* ocurrió el mismo fenómeno que con CA, es decir, la inhibición de este movimiento tuvo un carácter dosis dependiente dado a que a concentraciones muy bajas se observó el halo característico de este movimiento. En la figura 3.11. se muestran los resultados representativos para *swarming* de ambos compuestos.

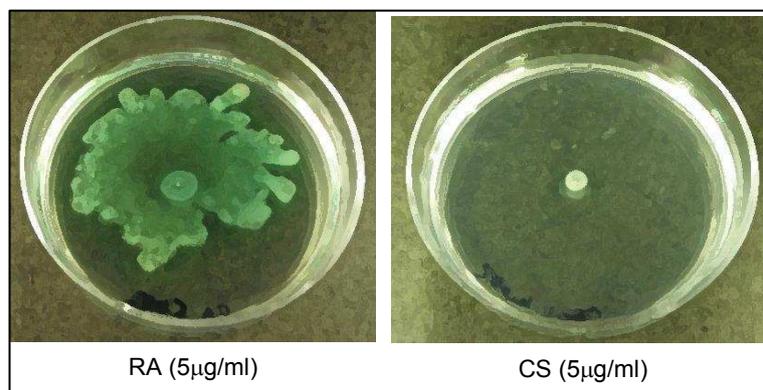


Figura 3.11. Figura representativa de la motilidad de *swarming* en presencia de RA o CS.

3.4.3. El CA afectaría el QS de PAO1 ocasionando la sobreproducción de AHLs.

La primera evidencia de que el QS podía tener influencia sobre la formación de *biofilm* fue reportado en *P. aeruginosa*, cuando se observó que una mutante en el gen *lasI* producía un *biofilm* más delgado y con mayor susceptibilidad a detergentes (Davies et al 1998). En base a estos datos bibliográficos y otros, se evaluó si CA podía afectar la producción AHLs debido a que los resultados previos obtenidos de motilidad (*swarming* y *twitching*) y *biofilm*, ambos regulados por el QS, fueron afectados. La bacteria se creció en medio mínimo FAB suplementado con casaminoácidos junto con CA a distintas dosis durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron las muestras para obtener el sobrenadante libre de células y el precipitado celular fue empleado para normalizar las muestras mediante la técnica de Bradford, mientras que del sobrenadante se extrajeron las AHLs (Materiales y Métodos). El extracto enriquecido en AHLs se analizó por cromatografía en una placa delgada de fase reversa TLC (del inglés Thin Layer Chromatography-C18), utilizándose la mezcla metanol/agua 60:40 (vol/vol) como solvente de migración, para favorecer la separación de las AHLs de acuerdo a su composición de cadenas carbonadas.

Para revelar y visualizar las AHLs se emplearon dos cepas biosensoras *Chromobacterium violaceum* O26 (CVO26) y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4. Ambas cepas son incapaces de producir sus propias AHLs, pero sí responden a moléculas de AHLs exógenas (Cha et al 1998). La cepa CV026 reconoce las moléculas con 4 a 6 átomos de carbono como C6-AHL y C4-AHL, mientras que la NTL4 reconoce AHLs de cadena larga, como C8-HSL, C10-HSL y C-12-HSL dando como resultado una coloración violeta o azulada respectivamente (Lowe et al 2009, McLean et al 2004). Una vez finalizada la corrida de cromatografía, se dejó evaporar el solvente de la placa y se colocó sobre la misma una capa de agar blando conteniendo una de las cepas biosensoras a fin de que luego de 24 horas y a la temperatura óptima para cada una de ellas, se revele la presencia o ausencia de las AHLs. La figura 3.12 muestra que la producción de C6-HSL y C4-HSL ni de C12-HSL y C10-HSL no estaba disminuida, por el contrario, estuvo incrementada con respecto al control en cualquiera de las dosis ensayadas. De acuerdo a los resultados, surge la hipótesis de que probablemente el CA interfiere con el sistema de sensado de AHLs de tal manera que origine una acumulación de las moléculas señal en el sobrenadante de PAO1, por ello el efecto observado.

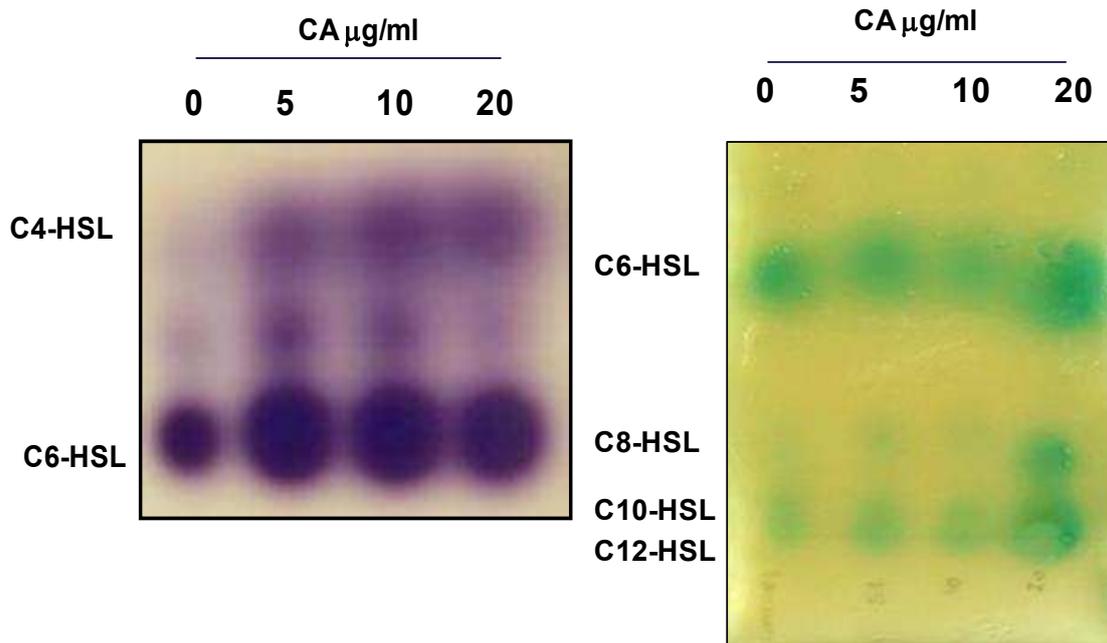


Figura 3.12. Análisis de AHLs producidas por PAO1 en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de CA, por cromatografía en capa delgada (TLC).

Las AHLs provenientes de cultivos de PAO1 en fase estacionaria, tratados o no con CA a las concentraciones indicadas, fueron extraídos con acetato de etilo y 5 µl de ellos fueron inoculados sobre la placa de TLC. Luego de la cromatografía se dejó evaporar el solvente y se cubrió con la cepa biosensora CV026 para detectar C4-HSL y C6-HSL (A) y la cepa biosensora NTL4 para detectar C10-HL y C12-HL.

Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la utilización de hojas frescas de romero contiene compuestos capaces de ejercer acción sobre el crecimiento de PAO1 a dosis subinhibitorias, entre ellas la potenciación de los antimicrobianos, la reducción de *biofilm*, los movimientos como *swarming* y *twitching*, y la interferencia de las moléculas de señalización correspondiente al sistema de QS: Estos datos obtenidos sugerirían que al emplear el romero o compuestos derivados de él como el CA frente a *P. aeruginosa*, ésta sería menos patogénica y por lo tanto reduciría las infecciones causadas por ella.

CAPÍTULO IV

4. Actividad anti-inflamatoria de *R. officinalis* y de los compuestos aislados de él *in vitro* e *in vivo*.

Los datos de la literatura sugieren a los polifenoles como agentes con propiedades anti-inflamatorias y su acción es ejercida en múltiples niveles: a través de las vías de señalización que involucra a las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Kong et al 2000);(Manna et al 2000, Wiseman et al 2001), por inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias y quimiocinas, la supresión de la actividad de la ciclooxigenasa (COX) (O'Leary et al 2004) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y por lo tanto la disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS). A la fecha se ha reportado para el caso de extractos de hojas **secas** de romero, en el que se observó actividad anti-inflamatoria tópica y que los compuestos obtenidos a partir de estos, como el ácido ursólico, el ácido oleanólico y el ácido micromérico, son eficaces anti-inflamatorios (Altinier et al 2007) y anti-tumorales (Peng et al 2007). En estudios *in vitro*, utilizando leucocitos polimorfonucleares humanos (PMN), células U937 y células epiteliales mamarias, tanto el CA y CS mostraron ser potentes anti-inflamatorios (Poeckel et al 2008; Subbaramaiah et al 2002; Yu et al 2009).

Para ahondar más sobre la acción anti-inflamatoria del romero y los derivados ya mencionados, se evaluaron *in vivo*, en ratones de la cepa Balb/c bajo dos modelos inflamatorios, un modelo de edema plantar y otro en la oreja de ratón. A su vez, los estudios se complementaron a nivel histopatológico a fin de visualizar *in situ* los efectos causados por los agentes inflamatorios empleados, y determinar la acción inhibitoria de los mismos. Posteriormente, se estudió *in vitro* el mecanismo de acción anti-inflamatoria del RETOH y de los compuestos CA y CS. Por un lado, sobre la producción de ROS y empleando la línea celular Raw 264.7 a las cuales se las desafió con lipopolisacárido (LPS) de *P. aeruginosa* sólo o en combinación con RETOH, CA y CS. Por otro lado, se evaluó, mediante la técnica de RT-PCR, la expresión de los mediadores inflamatorios en la oreja de ratón como ser COX-1, COX-2, IL-1B, ICAM-1, TNF- α y fibronectina, empleando G3DPH como gen constitutivo para normalizar los resultados obtenidos.

4.1. Acción antiinflamatoria del RETOH y de los compuestos aislados de él: estudios *in vivo*

4.1.1. La aplicación tópica de RETOH reduce la inflamación *in vivo* en el modelo plantar inducido con formaldehído y no tiene propiedades irritantes en piel de conejo.

Se realizaron estudios preliminares para evaluar las propiedades anti-inflamatorias de los extractos de romero, en el modelo del edema plantar inducido por el formaldehído en ratones de la cepa Balb/c, a fin de determinar qué tipo de aplicación (tópica o inyectable) es más adecuada para el empleo de los mismos. El formaldehído se inyectó en el tejido plantar de

ratones y seguidamente se aplicó el RETOH en la zona inflamada por vía tópica o por inyección, o ambos, como se describe en Materiales y Métodos. Luego de 16 horas se inspeccionó visualmente si había alguna diferencia notable entre los diferentes tratamientos y se encontró que aquellos ratones que habían recibido RETOH tópicamente la inflamación estaba notablemente reducida como muestra la imagen de la Figura 4.1.d. Seguidamente se midió con un calibre la zona plantar tratada o no con el RETOH para cuantificar lo observado. En la Tabla 4.1., se presentan estos resultados en donde la inyección de RETOH disminuyó el efecto del formaldehído en un 22% si se lo compara con el control (sólo con pinchazo), mientras que la administración tópica de RETOH redujo al 80% la inflamación. Posteriormente, se realizó un análisis histopatológico que reveló que el tratamiento tópico con RETOH redujo el número de leucocitos (un marcador del proceso inflamatorio) en el sitio de la inflamación (Figura. 4.1c), en comparación con la muestra inflamada (Figura 4.2.b). El control, al que se le inyectó solo PBS, descartó la posibilidad de que el pinchazo con la aguja genere por sí mismo un proceso inflamatorio. Seguidamente se evaluó al RETOH (30 mg/cm²) como agente irritante sobre piel de conejo. La inspección visual de los resultados indicaron que el RETOH a altas dosis, no causa eritema ni edema sobre la piel (Figura 4.1.e).

Tabla 4.1. Efecto del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* sobre el modelo de edema plantar inducido por formaldehído.

Tratamiento	Nº de ratones	Edema (cm)	Edema generado (tratamiento-control) (cm)	Reducción del edema (%)
Control	6	0.280 +/- 0.010	0	100
Control de inflación	6	0.330 +/- 0.016	0.050	--
Aplicación por inyección	6	0.319 +/- 0.010	0.039	22
Aplicación tópica	6	0.290* +/- 0.004	0.010	80
Aplicación por inyección + tópica	6	0.318* +/- 0.010	0.038	24

Los grupos experimentales fueron comparados con el control *p < 0,05

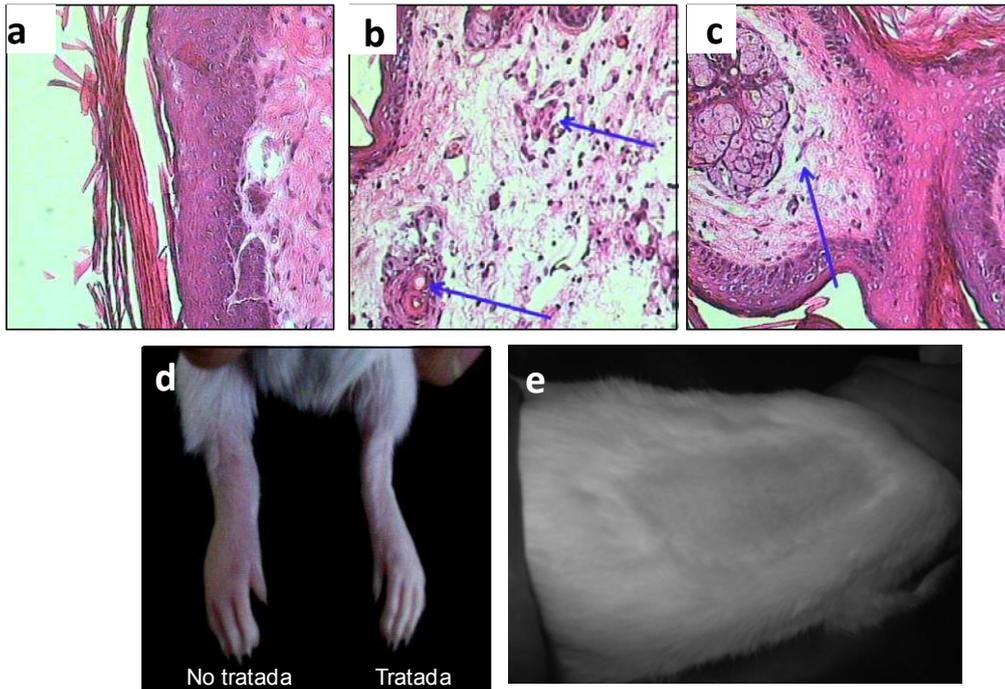


Figura 4.1. Reducción de edema plantar en ratones Balb/c tratados tópicamente con RE. La inflamación aguda fue inducida por la inyección de 20 μ l de formaldehído al 3% en PBS en la región subplantar. Posteriormente, los ratones fueron tratados tópicamente con 10 μ l de RE. Las muestras obtenidas, se fijaron durante la noche en el 4% de formaldehído y teñidas con H&E para su observación. (A) control, (B) formaldehído (3%), (C) tratadas tópicamente con RE después de la inyección de formaldehído, (D) Inspección visual de la reducción de la inflamación luego de la aplicación tópica de RE. (E) Piel de conejo luego de la exposición a RETOH.

4.2. El RETOH de hojas frescas de romero enriquecido de CA y CS, inhibe el proceso de inflamación con igual eficacia que la droga comercial indometacina.

En base a los resultados anteriores, se continuaron los ensayos de inflamación por aplicación tópica de extractos de romero y sus derivados en el modelo de edema en oreja de ratón inducido por PMA, dado a que es un modelo que permite el estudio en un corto tiempo la evaluación del efecto antiinflamatorio o no, de aquellos compuestos que se desea evaluar (Bralley et al 2008).

El ensayo comenzó con la aplicación de RETOH, CA o CS sobre la superficie cutánea interna de ambas orejas del ratón (cepa Balb/C), a las dosis indicadas. En otro grupo de ratones se empleó, control anti-inflamatorio, indometacina, un medicamento no esteroide utilizado para aliviar los síntomas causados por diferentes procesos inflamatorios (Hellewell et al 1992, Needham et al 1988, Williams et al 1986, Williams & Peck 1977). Luego de 30 minutos, tiempo suficiente para evaporar el solvente de los compuestos, se procedió a la administración tópica de un ester de forbol (PMA). El PMA es un buen agente irritante, que permite obtener una rápida respuesta inflamatoria en un corto tiempo y por ello se lo prefiere para estudiar procesos inflamatorios agudos. El PMA se suministró únicamente en la oreja derecha, mientras

que la izquierda fue pre-tratada con el vehículo (DMSO). Otro grupo de ratones fue empleado como control inflamatorio ya que no se les aplicó ninguno de los compuestos derivados de romero ni la indometacina. Transcurrida 4 horas desde el inicio del ensayo, se procedió a sacrificar los animales y a remover con un sacabocados las superficies tratadas y no tratadas para su pesaje en una balanza analítica y posterior análisis. Los resultados presentados en la Tabla 4.2., muestran que hay una relación dosis dependiente, es decir la reducción de la inflamación se correlaciona con el aumento en la dosis de los compuestos de romero. Se observó además, que el RETOH alcanza la CE₅₀ (concentración efectiva que reduce un 50% la inflamación) cuando se aplica 128,3 µg/cm² de este compuesto. En el caso de CA y CS mostraron una CE₅₀ de 10,20 µg/cm² y 10.70 µg/cm², respectivamente. Interesantemente el RETOH mostró un efecto antiinflamatorio similar al observado con la indometacina, mientras que CA y CS manifestaron una actividad anti-inflamatoria significativamente mayor que esta droga. Por lo tanto, CA y CS contribuyen a la actividad anti-inflamatoria observada en el extracto de romero *in vivo*. Interesantemente se puede determinar que se requiere una menor concentración de CA y CS para producir el mismo efecto que la droga comercial. Esto demuestra que el RETOH de hojas frescas de romero enriquecido principalmente con CA y en menor medida con CS, previene el desarrollo de la inflamación e indica que ambos compuestos bioactivos son potenciales candidatos para uso en procesos inflamatorios.

Tabla 4.2. Efecto anti-inflamatorio del RE, CA y CS sobre un edema en oreja de ratón generado por PMA.

Coumpound	dose (µg/cm ²)	Nº of mice	edema (mg)	edema reduction (%)	EC ₅₀ (µg/cm ²)
RE	10	10	3.26 ± 1.48	3.9	128.3
	20	10	3.13 ± 1.27	7.8	
	100	10	2.10* ± 0.50	38.2	
	250	10	0.71* ± 0.14	78.9	
	500	10	0.50* ± 0.14	84.3	
	1000	10	0.05* ± 0.08	98.6	
CA	2	10	2.03* ± 0.51	40.2	10.2
	10	10	1.73* ± 0.24	49.3	
	20	10	1.22* ± 0.26	64.1	
CS	2	10	2.10* ± 0.80	38.2	10.7
	10	10	2.03* ± 0.40	40.2	
	20	10	1.36* ± 0.40	59.8	
Indomethacin	500	10	0.27 ± 0.17	92.2	
PMA	4	10	3.40 ± 0.15		

Dosis efectiva 50%, Los grupos experimentales fueron comparados con el control; *p<0.05.

4.3. Análisis histopatológicos y de orejas de ratón tratadas con RETOH y CA

Seguidamente, se analizaron por histopatología todas las muestras con los diferentes tratamientos, con el objetivo de correlacionar los resultados obtenidos en el apartado anterior con las muestras histológicas. La observación al microscopio reveló la existencia de una marcada infiltración de leucocitos con ulceración epidérmica en las orejas tratadas con PMA (Figura 4.2.B y Tabla 4.2), característico de una inflamación aguda. Esto no ocurrió en la muestra control (sin el agente inflamatorio), siendo un resultado esperable para este caso (Figura 4.2.A). Al analizar la muestra pre-tratada con RETOH, se evidenció una leve vasodilatación similar a la tratada con indometacina y la acumulación de leucocitos en el sitio de la inflamación era escasa. El efecto del CA se analizó también por histopatología debido a que fue el compuesto con mayor acción anti-inflamatoria a la menor dosis empleada. En este caso, la muestra tratada con CA y posteriormente con PMA también mostró una leve vasodilatación y escasa o nula presencia de leucocitos (Figura 4.2.B y E). Estos resultados demostraron que tanto el RETOH y el CA actúan previniendo el proceso inflamatorio cuando se exponen las células a un agente irritante como el PMA (Figura 4.2.C y D).

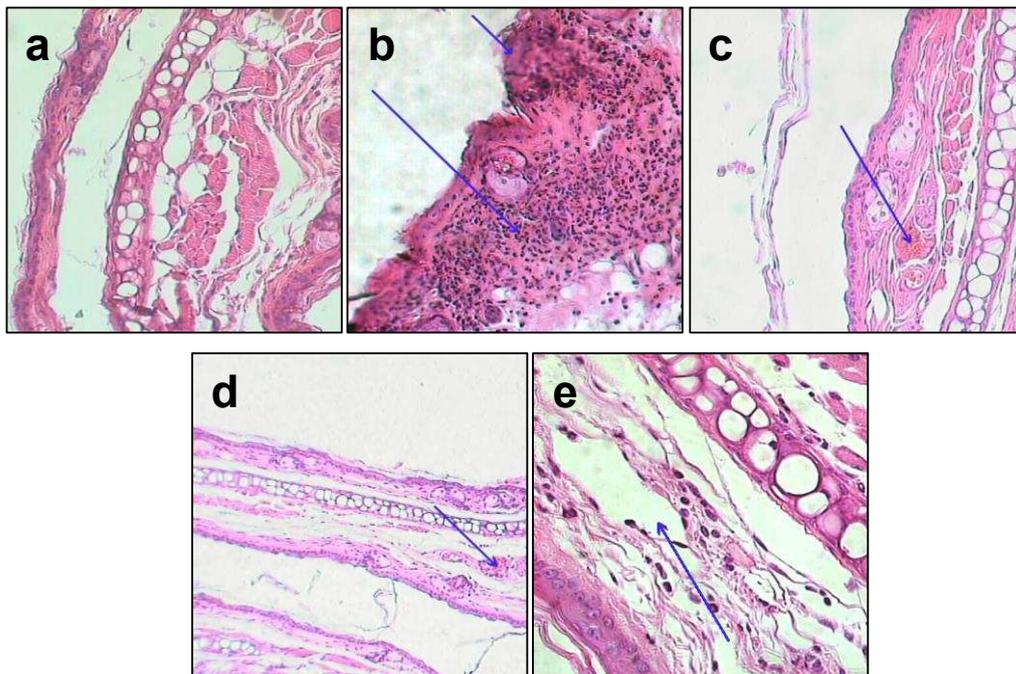


Figura 4.2. Reducción del edema en oreja de ratón inducida por PMA en ratones Balb/c tratados con RE y CA. Control (A), PMA (B), RE etanólico (1000 µg/cm²) (C), indometacina (500 µg/cm²) (D), CA (20 µg/cm²) (E). Las flechas indican la infiltración de leucocitos (B), vasodilatación (C y D), reducción en la acumulación de leucocitos (E).

4.4. Mecanismos de acción antiinflamatoria del RETOH, CA y CS: estudios *in vitro*

4.4.1. La liberación de NO₂ en macrófagos murinos RAW 264.7 estimulados por LPS, disminuye en presencia de RETOH, CA y CS de manera dosis dependiente.

El óxido nítrico es un gas simple, liberado por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina, por acción de la enzima sintasa de óxido nítrico (NO), la cual tiene una amplia distribución en el organismo. Se conocen 3 isoformas de la enzima NOS, según su actividad, localización celular y clonación molecular, 2 de ellas constitutivas y la tercera inducible (iNOS). La isoforma inducible (iNOS o NOS2) es independiente del calcio. Se expresa *in vivo* en las células epiteliales bronquiales, tanto de sujetos sanos como de asmáticos, y aumenta su actividad durante ciertos procesos inflamatorios. La iNOS también se expresa *in vitro* tras estimulación con citocinas, endotoxinas y lipopolisacáridos. La iNOS produce grandes cantidades de NO, del orden de nanomoles, y es bloqueada por los glucocorticoides, fármacos que no afectan a las isoformas constitutivas. Actualmente se le concede al óxido nítrico una gran importancia en el estudio de enfermedades inflamatorias como en el asma y la FQ. En situaciones patológicas de estrés oxidativo, el NO inhibe los linfocitos Th1, la producción de INF- γ , y actúa como modulador de la respuesta inflamatoria. En niños asmáticos aumenta la expresión de iNOS en células epiteliales, eosinófilos, neutrófilos y mastocitos, lo que da lugar a grandes cantidades de NO y metabolitos como el peroxinitrito, que generan hiperreactividad bronquial, daño epitelial entre otras cosas. Por lo tanto, los compuestos capaces de reducir la producción de NO por la enzima sintasa inducible de NO (iNOS), son efectivos como agentes anti-inflamatorios (Maiuri et al 2005). La reducción de la liberación de NO, fue evaluada para RETOH, CA y CS. Para ello se estimularon macrófagos murinos perteneciente a la línea RAW 264.7 con LPS comercial de *P. aeruginosa*, para promover la generación de NO y liberación de nitritos (NO₂⁻) en el medio de cultivo (Kleinert et al 2004). Previamente, las células fueron preincubadas con 12, 25 o 50 $\mu\text{g/ml}$ de RETOH o 3.125, 6.25, 12.50 25 o 50 $\mu\text{g/ml}$ de CA o CS durante dos horas para favorecer la incorporación de los compuestos a la células debido a la baja solubilidad de los mismos en medios acuosos y luego se estimularon con 1 $\mu\text{g/ml}$ de LPS durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron los sobrenadantes y se midió la concentración de nitritos empleando el método de Griess (Materiales y Métodos). Los resultados se muestran en la Figura 4.3, que el LPS estimuló la producción de NO de manera significativa, a razón de 8 veces más que en el control (sin LPS). La administración de RETOH, CA y CS al medio de cultivo, indujo una reducción significativa de NO, de manera dosis dependiente. A 50 y 25 $\mu\text{g/ml}$, el RETOH y CS inhibieron aproximadamente el 50% de los nitritos, mientras que CA a 25 $\mu\text{g/ml}$ inhibió el 75% de la producción de nitritos si se lo compara con el control tratado solamente con LPS. Los efectos de citotoxicidad de los compuestos fue evaluada previamente y ninguno de ellos afectaron la viabilidad de las células RAW 264.7 a las concentraciones empleadas. Estos resultados indican que los compuestos poseen un potente efecto antiinflamatorio dado a que se redujo notablemente la producción de NO.

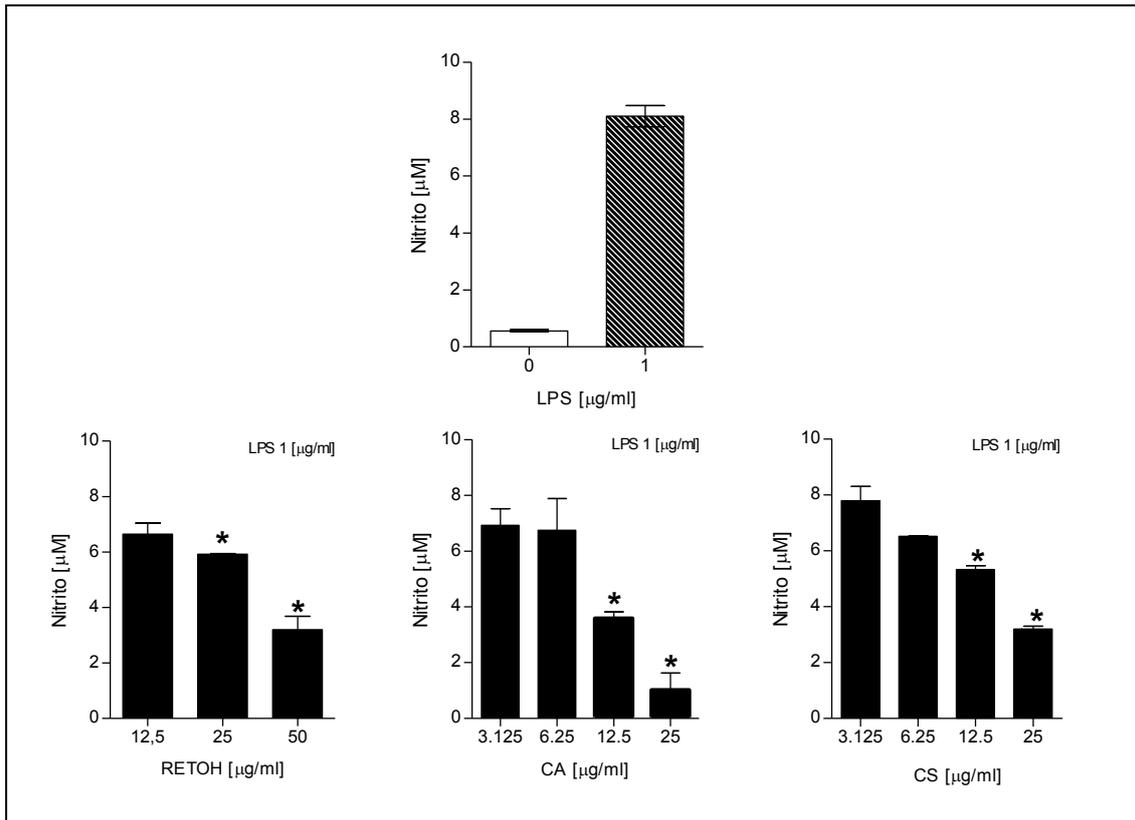


Figura. 4.3. Efecto de la RE, CA y CA en la acumulación de nitrito en el medio de cultivo de macrófagos RAW 264.7. Las células RAW 264.7 fueron tratadas con concentraciones crecientes de REOH, CA y CS durante 2 h previo a la estimulación con LPS (1 µg/ml) 2 h más tarde. Después de 24 h, se midió la concentración de nitritos en el medio de cultivo, mediante la técnica de Griess. Los datos son representativos de tres experimentos independientes y muestran la media ± DE de las muestras por triplicado, *p <0,05, en comparación con las células tratadas con LPS solamente.

4.5. Efecto del CA y CS sobre la expresión moléculas pro-inflamatorias

Se ha visto que los polifenoles pueden ejercer sus propiedades anti-inflamatorias en múltiples niveles, a través de la modulación de las vías de señalización MAPK, Akt y NF-κB, por la inhibición de la producción de inflamatoria citocinas y quimiocinas, la supresión de la actividad de la COX y la iNOS y la disminución de la producción de ROS / RNS (Ichikawa, D., et al. 2004).

Para determinar que ocurría con la expresión *in vivo* de los ciertos genes pro-inflamatorios se analizó la expresión de los mismos en las muestras de las orejas de ratón tratada con REOH, CA y CS mediante la técnica de RT-PCR. Los genes estudiados fueron COX-1, COX-2, IL-1β, ICAM-1, TNF-α, fibronectina, y gliceraldehido-3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los resultados obtenidos para cada tratamiento se presentan en la Figura 4.4, en dónde se observó que bajo condiciones normales el control (sin inducir la inflamación), mostró la expresión basal de los genes constitutivos COX-1, fibronectina, ICAM-1 y G3PDH. En cuanto

a la expresión de los genes analizados, se observó diferencias significativas entre el control y las muestras tratadas ($p < 0,05$) excepto para COX-2 en donde la expresión fue únicamente observada para la inflamación generada con PMA. El análisis de TNF- α determinó que el pretratamiento con CA redujo su expresión en un 53% mientras que con CS un 18.2%, pero ambos fueron efectivos en disminuir la inflamación. De la misma forma, los niveles de IL-1 β fueron menores con CA y CS. La dosis empleada de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ suprimieron la expresión de IL-1 β a valores muy similares: 67.64% para CA y 65.06% para CS, si se lo compara con la muestra tratada con PMA sólo. Estos resultados confirmarían la capacidad anti-inflamatoria de CA y CS.

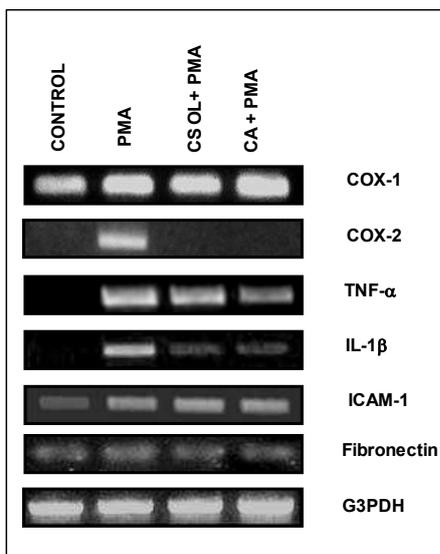
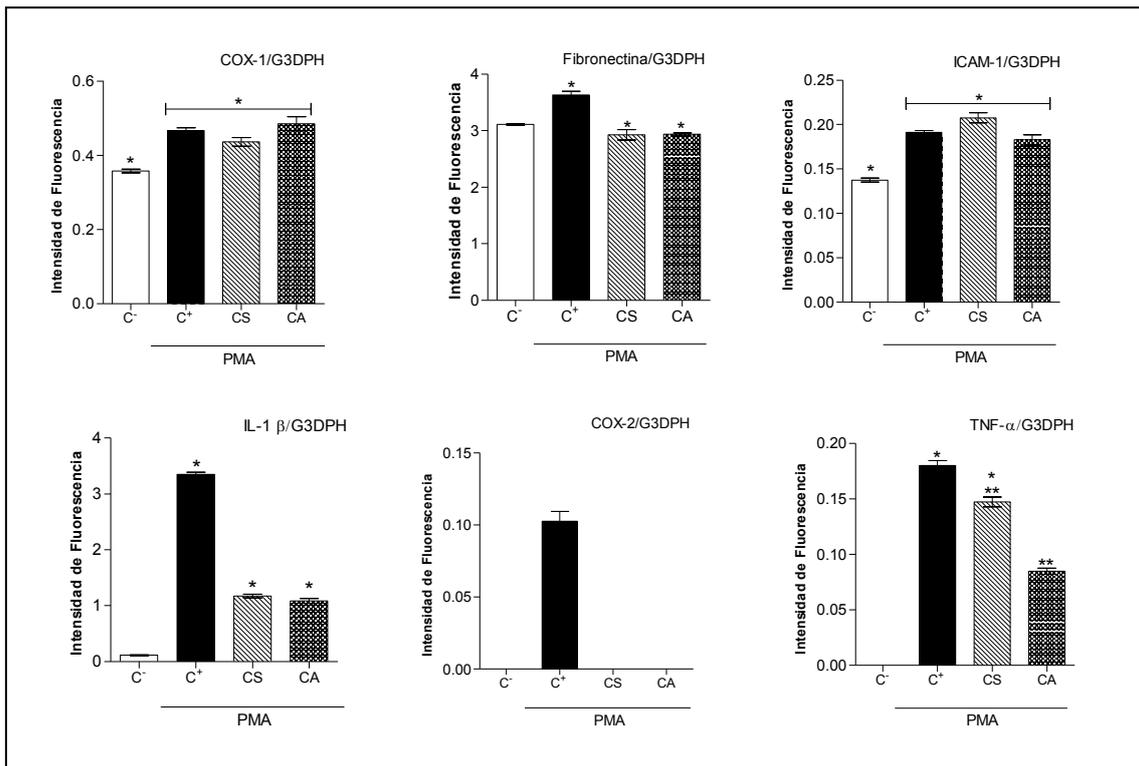


Figura 4.4. Efecto de CA y CS sobre la expresión de los mediadores inflamatorios mediante la técnica de RT-PCR Análisis representativo de las RT-PCR donde las bandas se normalizaron con la expresión del gen constitutivo G3PDH. En el gráfico se muestra la media como \pm D.E y donde *, ** $p < 0,05$ señala la diferencia entre los tratamientos.

CAPÍTULO V

5. Estudio de los efectos del xilitol sobre PAO1 y Calu-3, como potencial uso en pacientes con FQ.

En la actualidad, hay varios estudios que proponen al xilitol como compuesto natural para erradicar *biofilms* bacterianos, debido a su propiedad anti-adherente sobre ciertas bacterias (Fátima 2009, Silva 2010, Solange Inês Mussatto 2002). Por ejemplo, Ferreira y col. (Ferreira 2009) observaron, por medio de pruebas *in vitro*, que aunque el xilitol (1, 5, y 10%) no tenía ninguna actividad antibacteriana sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, sí presentaba una propiedad anti-adherente y como consecuencia la bacteria no era capaz de formar *biofilm*. La bibliografía sobre el mecanismo de acción de este compuesto sobre *P. aeruginosa* y en el complejo *Burkholderia cepacia* es escasa y hasta el momento se sabe que el pre-tratamiento con xilitol a explantes de epitelio respiratorio provenientes de pacientes sanos, reduce la adherencia de *B. cepacia* entre un 67 y 80 % y la combinación con lactoferrina disminuye el *biofilm* de *P. aeruginosa* (Ammons MC 2009). Por lo que estudiar los mecanismos de acción, abre la posibilidad de incorporar al xilitol como agente potenciador de otros compuestos.

En los últimos años se han presentado numerosas evidencias que apoyan la idea que las células del epitelio bronquial actúan como “barrera” de sustancias y microorganismos provenientes del exterior, regulando la puesta en marcha y funcionamiento de la proliferación, inflamación, y reparación de las vías aéreas tanto en situaciones fisiológicas como en las diferentes patologías respiratorias (Proud & Leigh 2011). La posibilidad de cultivar en forma aislada (sin contacto con células inmunes ni de otro tipo) células epiteliales bronquiales de origen humano, permiten estudiar y comprender mejor los fenómenos relacionados con ellas. Al cultivar las células en forma de monocapa (membranas de una célula de espesor depositadas sobre colágeno) en una interface entre medio de cultivo líquido (en la base) y aire (en el extremo ciliado) se mantiene la semejanza anatómica y funcional con el epitelio *in vivo*. Calu-3 es una línea celular de origen humano que presenta estructura y funciones muy similares al epitelio bronquial humano normal y es por ello muy utilizada como modelo en estudios fisiológicos y farmacológicos del epitelio de las vías aéreas (Zhu et al 2010), (Borot et al 2009), por ello su elección como modelo de estudio.

En este capítulo de tesis se presentan los resultados obtenidos con el tratamiento de xilitol sobre la cepa PAO1, su efecto sobre la producción de los factores de virulencia y su regulación a través del sistema de quorum sensing (QS) (Musthafa et al 2012). A su vez, se detallan los resultados obtenidos sobre la línea respiratoria humana Calu-3, la expresión de especies reactivas del nitrógeno (RNS) y del oxígeno (ROS) y de mediadores inflamatorios como IL-8, cuando se co-incubaban las células con sobrenadante proveniente de cultivos de PAO1 tratado o no con xilitol.

5.1. El xilitol impide la producción de piocianina de *P. aeruginosa* PAO1 sin afectar su crecimiento.

Para evaluar el efecto del xilitol sobre el crecimiento de *P.aeruginosa* PAO1, se partió de un cultivo en fase estacionaria en LB, diluido a una D.O._{600nm} de 0,01 en el mismo medio, que contenía xilitol en el rango de 0 a 10%. Los cultivos se dejaron crecer por 24 horas a 200 rpm y 37°C, y a distintos tiempos se tomaron alícuotas a fin de obtener una curva de crecimiento de PAO1 en función del tiempo. A partir de los resultados Figura 5.1 no se observó diferencia en el crecimiento de PAO1 entre el control (sin xilitol) y en presencia de xilitol, coincidiendo los resultados con otros grupos (Zabner 2000).

P. aeruginosa se caracteriza por liberar pigmentos, en particular la piocianina, que es fácilmente detectable gracias a que el medio de crecimiento se torna de un color verde-azulado. Los cultivos que fueron crecidos luego de 24 horas en presencia de xilitol demostraron una disminución en la liberación de piocianina dado a que el color del medio se tornaba de color ámbar a medida que aumentaba la concentración de xilitol. La inspección visual de los tubos permitía inferir que la liberación de la piocianina era de manera dosis dependiente (Figura 5.1A) Para confirmar cuantitativamente lo observado, se realizó la extracción de piocianina liberada al sobrenadante empleando cloroformo-HCl (Materiales y Métodos), a fin de capturar todo pigmento liberado por la bacteria bajo las distintas condiciones de crecimiento. Para cuantificarlo, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 420 nm y los resultados fueron graficados como inhibición de la producción de piocianina (%) en función de la concentración de xilitol, normalizándolos respecto al control (sin xilitol). Esta determinación permitió confirmar lo que inicialmente se había observado: el xilitol afecta de manera dosis dependiente la producción de piocianina en PAO1, alcanzando el 50% de inhibición cuando se emplea xilitol al 10% (Figura 5.1 B).

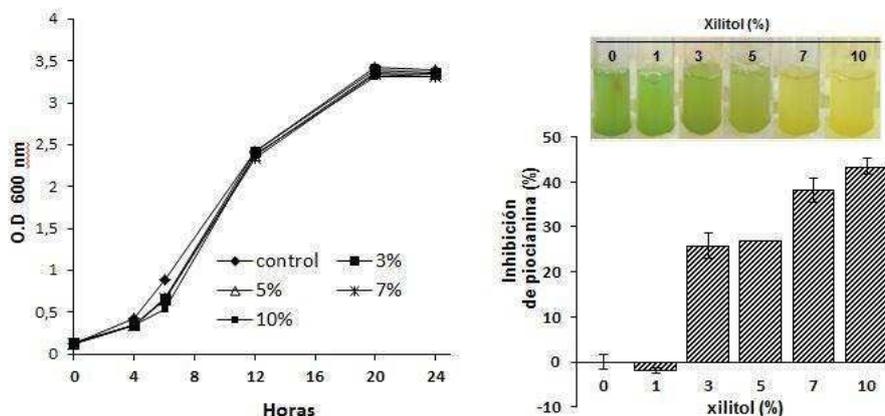


Figura 5.1. (A) Curva de crecimiento de PAO1 en presencia de xilitol. La cepa PAO1 se cultivó en LB a 200 rpm y 37°C. Posteriormente, el cultivo se diluyó a una D.O. 600nm de 0,01 en LB con o sin xilitol a (continuación) las dosis indicadas, y se cultivó nuevamente en las mismas condiciones. A distintos tiempos se tomó una alícuota de cada uno de los tratamientos y, midiéndose la O.D. a 600 nm, se realizó

(continuación) una curva de de crecimiento. Los datos se expresan como la media \pm D.E de cada una de las muestras. Los ensayos se realizaron por triplicado. **(B) Inhibición de piocianina por xilitol.** La cepa PAO1 diluida a una D.O._{600nm}=0.01 fue crecida en LB durante toda la noche en presencia o ausencia de xilitol a 37°C y 200 rpm, en los porcentajes indicados. La disminución de piocianina se visualizó por reducción en la coloración verde-azulada liberada al medio de cultivo (a), y se cuantificó, posterior a su extracción con cloroformo-HCl, a una D.O. de 420 nm. La cantidad de pigmento liberada al medio se expresó en función del control (PAO1 sin xilitol) en porcentaje (%) (b).

5.2. El xilitol afecta la formación del *biofilm* en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

Además de la liberación del pigmento al medio extracelular, se encontró que la formación del *biofilm* también estaba afectado en presencia de xilitol, porque en el tubo control (sin xilitol) se podía apreciar la presencia de esta estructura mientras que en presencia de xilitol había una reducción significativa del mismo (Figura 5.2.A). Para cuantificarlo, se decidió reproducir el experimento en las mismas condiciones de crecimiento pero en placas de poliestireno de 96 pocillos sin agitación, dado a que resultaba más sencilla su cuantificación. La incubación con xilitol (0-10%) se realizó durante 24 La cantidad de *biofilm* formado se determinó con el colorante cristal violeta (ver Materiales y Métodos). Los valores obtenidos se expresaron como porcentaje de *biofilm* formado, normalizándolo con el crecimiento bacteriano. Para la valoración se tomó como el 100% de *biofilm* a la muestra control que no contenía xilitol. De acuerdo a los resultados, la formación de *biofilm* disminuyó un 50% en 5, 7 o 10 % de xilitol.

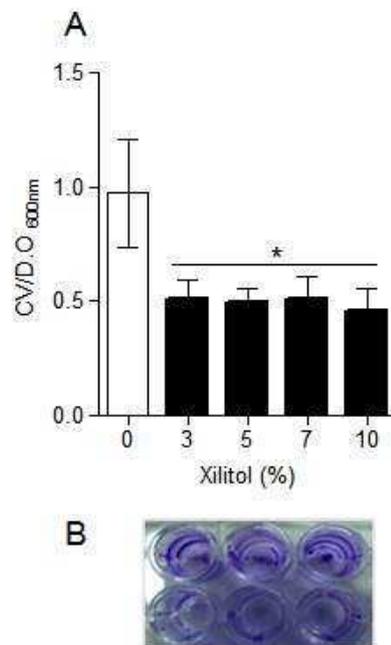


Figura 5.2. Formación de *biofilm* en presencia de xilitol. La cepa PAO1 se diluyó a una D.O. _{600nm} =0,01 y se cultivó en LB en presencia o ausencia de xilitol a los porcentajes indicados en placa de 96 pocillos. Los datos se expresan como la media \pm D.E de cada una de las muestras * p <0,05, en comparación con las células tratadas PAO1 sin xilitol (A). Imagen representativa de la formación de *biofilm*, fila superior, control; fila inferior cultivo en presencia de 7% de xilitol.

5.3. El xilitol reduce la liberación de proteasas al medio extracelular

Dado a que se observó que el xilitol redujo tanto el *biofilm* como la piocianina en la cepa PAO1, se prosiguió a determinar si otros factores relacionados con la virulencia estaban afectados. Entre ellos, la actividad de enzimas con actividad proteasa. Inicialmente se evaluó la presencia de proteasas en el sobrenadante de PAO1 mediante el ensayo de degradación de caseína, valorado en función del tiempo. El método consiste en incubar sobrenadante libre de células con la caseína (blanca) y registrar su degradación a 490 nm distintos tiempos hasta alcanzar el límite máximo de degradación. La valoración de las muestras analizadas se presentan en la Figura 5.3., e indica que aquellas que fueron incubadas con xilitol, retrasó la digestión de la caseína de manera dosis dependiente. Es decir, a t=30min el control (0% de xilitol) degradó alrededor de 82.5% de caseína manteniéndose en ese valor hasta el final de la medición. Para el caso de las muestras que contenían xilitol, la degradación fue de manera escalonada 75% para 5% de xilitol; 66.4% para 7 % de xilitol; y de 55% cuando se emplea 10% del compuesto. De acuerdo a los valores obtenidos, los resultados estarían indicando dos posibles eventos: que el xilitol afecte la producción de las proteasas de PAO1 de manera dosis dependiente y por ende disminuya la liberación de estas al sobrenadante, o afecte únicamente la actividad de las proteasas y por ello se observe menor actividad proteolítica de las mismas, o bien ambas posibilidades.

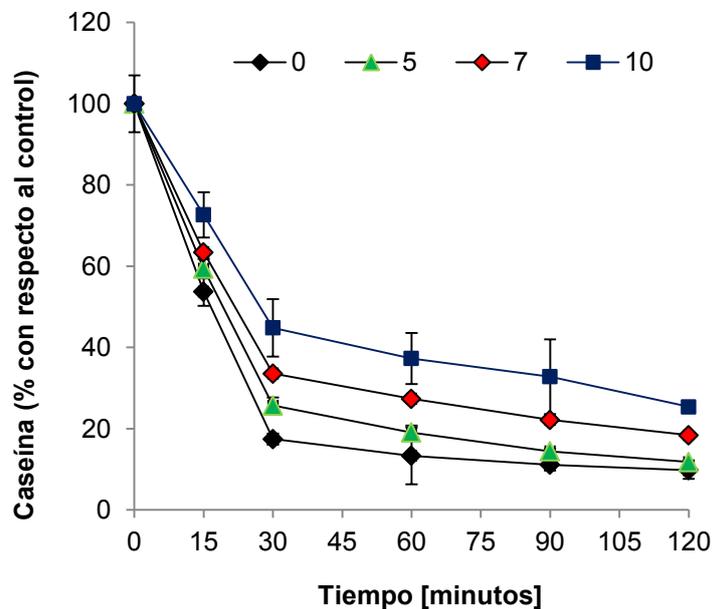


Figura 5.3. Actividad de proteasas a partir de los sobrenadantes de cultivo de PAO1 en presencia de xilitol. PAO1 fue incubada con xilitol en el rango de 0-10 %, en medio LB durante 24 h a 37°C y 200 rpm. Posteriormente los sobrenadantes de los cultivos fueron filtrados y se añadió una alícuota a un pocillo que contenía leche descremada al 5%. La actividad de las proteasas se registró durante 40 minutos en un lector de Elisa a 490 nm. Los datos se expresan como la media \pm D.E de cada una de las muestras basado en el promedio de los resultados de tres ensayos independientes.

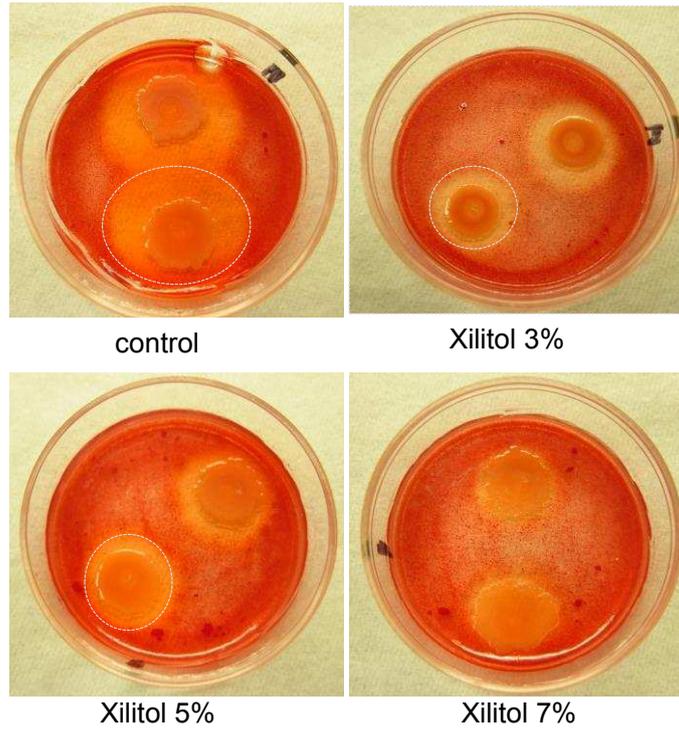
5.4. El xilitol afecta la acción de LasB pero no la actividad de LasA.

Seguidamente se determinó la actividad de otras dos enzimas con actividad exoproteasa presentes en *P. aeruginosa*, la elastasa A (LasA) y elastasa B (LasB). Ambas enzimas actúan conjuntamente para romper la elastina del tejido conectivo y los vasos sanguíneos (Rust et al 1994) y han sido halladas en los pulmones de pacientes con FQ. La proteasa alcalina LasA abre las cadenas de elastina permitiendo el acceso a otras proteasas para la degradación de elastina producida por los neutrófilos, entre ellas LasB (Kessler et al 1997). LasB no sólo destruye elastina sino también otros componentes del tejido como colágeno y fibrina, y también interfiere con los mecanismos de defensa del huésped inactivando sustancias tales como inmunoglobulinas humanas G y A, lisozima de las vías respiratorias.

Para estimar la actividad de LasA se agregó a 900 μ l de una suspensión de *S. aureus* inactivada por calor, 100 μ l de cada sobrenadantes del cultivo de PAO1 con xilitol (0-10%) (ver Materiales y Métodos). La actividad estafilolítica de LasA de cada muestra fue determinada espectrofotométricamente controlando la disminución de la absorbancia a 595 nm, cada 5 min durante 1 h (Diggle et al 2002). Durante ese tiempo, no se detectó diferencias entre las muestras por lo que se concluye que la actividad de LasA no se encuentra afectada por el xilitol a ninguna de las dosis evaluadas.

Por otra parte, la actividad de la enzima LasB fue medida empleando placas de LB-agar que contenían elastina acomplejada con rojo Congo (Sigma-Aldrich), donde a su vez distintas concentraciones de xilitol fueron agregadas a las placas. Luego de que el agar solidificó, se inocularon 2 μ l de un cultivo de PAO1 crecido en LB durante toda la noche y se guardaron a 37°C hasta la aparición del halo de degradación. Todas las placas fueron inspeccionadas (Figura 5.4A) a las 24 h donde se registró actividad elastolítica en la placa control y las que contenían 3 y 5% de control. Mientras que a dosis superiores del 7% no se registró ningún halo alrededor de la colonia. Sin embargo pasadas las 48 h de inoculación comenzaron a aparecer signos de degradación de elastasa. Esos datos fueron graficados tomando como referencia el área de la colonia junto con el área del halo de degradación correspondiente. La resta de ambas áreas me indicaba la superficie degradada de elastina. Esos datos fueron normalizados con el área de la placa y se graficaron los resultados obtenidos. Si se toma como el 100% de degradación al control (0% de xilitol) (Figura 5.4.B) se obtiene que con 3% de xilitol la degradación alcanza un 67% de degradación; 50% con 5% de xilitol; 26% con 7% de xilitol y 10% con 10% de xilitol, indicando una relación dosis respuesta.

A



B

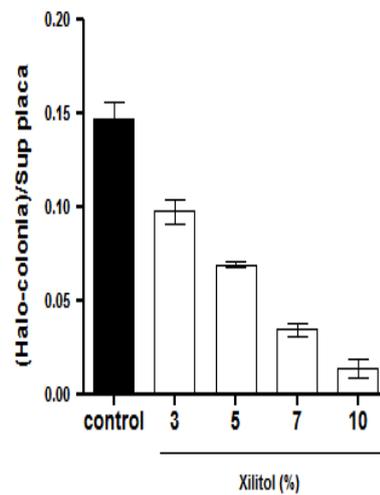


Figura 5.4. Actividad elastolítica de LasB en presencia o ausencia de xilitol. Actividad de la enzima LasB. Placas de elastina-rojo Congo a los días 1 y 3 (A) Medición cuantitativa de la actividad degradativa de LasB en función de los distintos porcentajes de xilitol (B). Cada ensayo se realizó por duplicado en la misma placa y a su vez por triplicado. Los datos se expresan como la media \pm D.E de cada una de las muestras * $p < 0,05$, en comparación con las células PAO1 sin xilitol.

5.5. El xilitol afecta los movimientos de *swarming* y el *twitching* pero no el *swimming* de PAO1

El efecto del xilitol sobre los procesos relacionados a la formación de *biofilm* como *swimming*, *swarming* y *twitching*, también fueron estudiados en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Con este objetivo, se cultivó la bacteria durante toda la noche y se inoculó sobre placas de motilidad con los porcentajes de agar correspondientes al tipo de movimiento que se procuraba estudiar (*swimming* 0,3%, *swarming* 0,5% y *twitching* 1,5 %), conteniendo xilitol a los porcentajes indicados. Para el *swimming* y *swarming* se inoculó 2 μ l de cultivo mientras que para el *twitching* se empleó un palillo impregnado con las bacterias para poder atravesar la capa de agar y alcanzar el fondo de la placa. Luego de 24 h a 30°C para el *swarming* (Figura 5.5) y 37°C para el *twitching* (Figura 5.6), se observó que el xilitol redujo notablemente ambos tipos de motilidad de manera dosis dependiente. En cuanto al *swarming* se evidenció que a concentraciones mayores de 5%, hubo una reducción en la formación de dendritas (Figura 5.5 B-C). En cuanto al *twitching*, en el control (sin xilitol) apareció el halo característico de este tipo de movimiento, presente entre la placa y el agar, mientras que estaba ausente en los diferentes tratamientos con xilitol (Figura 5.6A). Posteriormente, se examinaron los cambios morfológicos de las colonias por microscopía óptica; específicamente las zonas periféricas dónde las bacterias se desplazan radialmente para desarrollar el *twitching* y colonizar nuevas superficies. En ausencia de xilitol (control), se comprobó que las bacterias emergían desde los bordes, migrando hacia otras áreas de la placa (Figura 5.6B). Este fenómeno no se visualizó en presencia de xilitol, dado a que exhibía un borde uniforme indicando que las bacterias quedaban retenidas en la colonia. (Fig.5.6 B c y d). Con respecto al *swimming* no se distinguieron diferencias significativas por la presencia de xilitol en la placa.

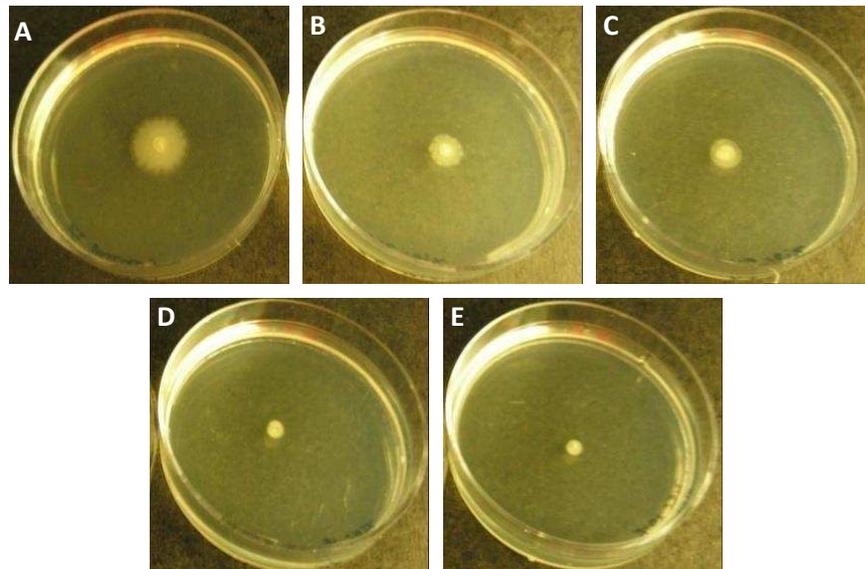


Figura 5.5. Imágenes de la motilidad de *swarming* de PAO1 en presencia de xilitol. PAO1 fue inoculada sobre placas de LB-agar suplementada con 0% (A) 3 % (B), 5% (C), 7% (D) y 10% (E) de xilitol. Luego de 24 h a 30°C las placas fueron inspeccionadas para determinar en cuales se desarrolló el *swarming*.

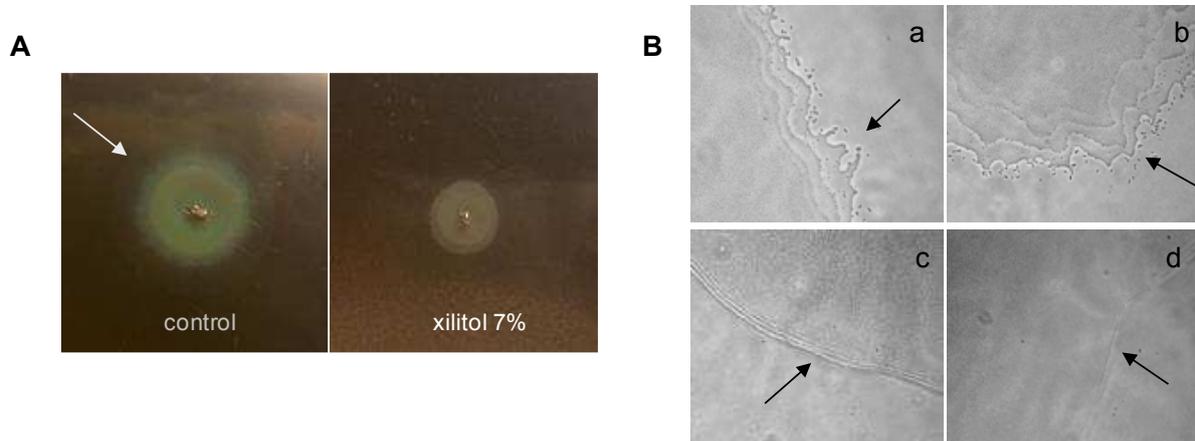


Figura 5.6. Ensayo de motilidad de twitching para cepa PAO1 de *P. aeruginosa*. La bacteria fue inoculada a través de una capa delgada de LB agar (1%) conteniendo xilitol a distintos porcentajes, para visualizar el movimiento dependiente de *pilus* tipo IV, en la interface agar-placa de petri. Luego de 24 horas de incubación se inspeccionaron las placas Izquierda A: control (a); xilitol 7% (b). Derecha B: Análisis microscópico (200X) de los bordes de las colonias que se expandieron en la interface agar-placa de petri. Control (a), xilitol al 3% (b), xilitol 5% (c), xilitol 7% (d). Cada experimento fue realizado por triplicado. La flecha indica la difusión de la colonia en el espacio intersticial entre el agar y la placa.

5.6. Producción de ramnolípidos en presencia de distintas dosis de xilitol

Como la motilidad de *swarming* estaba afectada, se evaluó si una de las posibles causas era por la reducción de la producción de ramnolípidos. Estas moléculas anfipáticas, compuestas por L-ramnosa y ácido 3-hidroxisalcanoico, identificado por primera vez a mediados del 1900 en cultivos de *P. aeruginosa* (Hauser 1957) son las responsables en parte, de este tipo de movimiento en esta y otras bacterias. Por ello, se decidió reproducir el ensayo de *swarming* bajo las mismas condiciones descriptas anteriormente pero agregando azul de metileno (5 $\mu\text{g/ml}$) y CTAB (0,2 mg/ml) al agar porque facilita la precipitación de los ramnolípidos. Como consecuencia de ello se origina un halo de color azul alrededor de la colonia, indicando la presencia de los ramnolípidos sin afectar la viabilidad de la bacteria. Bajo estas condiciones se puede determinar si las colonias en presencia de xilitol o cualquier otro compuesto que se quiera evaluar producen o no ramnolípidos. Para este caso, luego de 24 horas a 30°C se inspeccionaron las placas observándose que aquella que no contenía xilitol (control) desarrolló el movimiento de *swarming* dado por la presencia de dendritas características del movimiento. Por otra parte en el punto de siembra, se visualizó el halo azul (Figura 5.7. A), indicativo de la presencia del biosurfactante tal como se esperaba para el control; mientras que las bacterias que fueron inoculadas en las placas que contenían xilitol no

se desarrolló el halo azul (Figura 5.7. B). Este resultado indicaría que el xilitol afecta también la producción de ramnolípidos y eso da como resultado inhibición del movimiento de *swarming*.

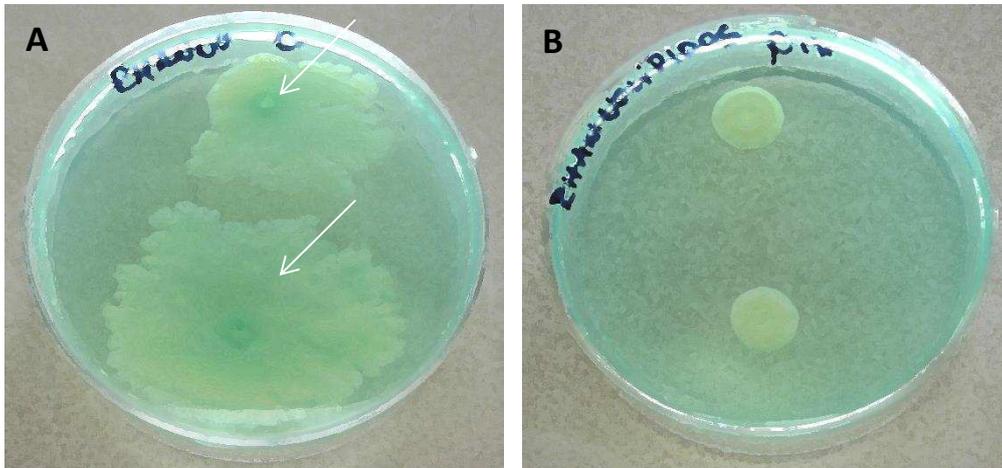


Figura 5.7. El *swarming* se inhibe por reducción en la producción de ramnolípidos. Imagen representativa de producción de ramnolípidos en ausencia (control) o presencia de xilitol 7%. PAO1 fue inoculada por duplicado en una placa de LB-agar al 0,5% conteniendo azul de metileno y CTAB para visualizar la presencia de ramnolípidos. Luego de 24 horas se inspeccionaron las placas. Cada ensayo se realizó por duplicado sobre la misma placa tres veces.

5.7. Acción del xilitol sobre la producción de factores de virulencia por interferencia en la regulación génica del sistema de QS

Debido a que el xilitol afectó varios factores de patogenicidad de *P. aeruginosa*, como la producción de pirocinanina, la formación de *biofilm*, la actividad de proteasas como LasB, la motilidad y la producción de ramnolípidos se decidió investigar si los resultados observados se debían a que este compuesto estaba ejerciendo su efecto sobre el sistema de QS, siendo este un mecanismo importante de regulación de estos factores de patogenicidad tanto en Gram negativas como en Gram positivas (Reading & Sperandio 2006). Para los sucesivos ensayos, se decidió continuar con 7% de xilitol, dado a que este porcentaje de xilitol es el que encuentra en muchos fluidificantes para la higienización de las fosas nasales, especialmente en pacientes que sufren otitis media recurrente (Camps Rubiol T 1999), en cuyas infecciones los patógenos más frecuentes son *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, y menos frecuente *P. aeruginosa*.

La obtención de AHLs se realizó con acetato de etilo acidificado, como se describe en Materiales y Métodos y se sembró una alícuota de cada muestra (normalizado con la D.O. de crecimiento) sobre una placa C18 de fase reversa. La presencia de las moléculas de AHL en la placa cromatográfica fue visualizada empleando la cepa *A. tumefaciens* WCF47 que detecta AHLs de variadas estructuras y tamaños. Los resultados se cuantificaron por densitometría empleando el programa ImageJ 1.41, y se graficó densidad en función de las AHLs producidas.

Los resultados obtenidos revelaron que el cultivo de PAO1 sin xilitol (control) mostró la presencia de las moléculas C12-HSL, C8-HLS y C6-HSL (Figura 5.8.A), mientras que el cultivo en presencia de xilitol mostró un 50% de reducción en las especies C6-HLS, C8-HLS y del 90% en C12-HLS.

Por otra parte, y como se mencionó anteriormente, la producción de diversos factores de virulencia bacterianos está regulada por el sistema de quorum sensing (QS). Una de las hipótesis surgida a partir de los experimentos fue que el xilitol podría estar interfiriendo con la expresión de las sintasas de AHLs. Para corroborar esta idea, se evaluó la expresión de los genes involucrados en la síntesis de las sintasas de AHLs utilizando el gen reportero de LacZ. En la cepa PAO1 se introdujo un plásmido que contenía un fragmento de la región promotora del gen sintasa *lasI*, responsable de la producción de 3-oxo-C12-HSL o del gen *rhlI* responsable de la producción de C4-HSL ambos fusionados al gen reportero *lacZ*. Las colonias transformadas de PAO1 con los plásmidos pME3853 ($\Delta lasI::lacZ$) y pME3846 ($\Delta rhlI::lacZ$) fueron crecidas en medio con LB sólo o en presencia de xilitol 7%. Luego de 24 horas, se midió la expresión de la β -galactosidasa utilizando ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) como sustrato, el cual permitió medir, de manera indirecta, la expresión de *lasI*. En el control, la expresión de los genes de las sintasas, alcanzó alrededor de 9000 unidades Miller para ($\Delta rhlI::lacZ$) y 11000 unidades de Miller para ($\Delta lasI::lacZ$). En cambio para el cultivo tratado con xilitol 7% la expresión para ambas sintasas alcanzó 2000 unidades Miller, representando una inhibición de la expresión de las enzimas de un 80% y 78%, respectivamente (Figura 5.9. B).

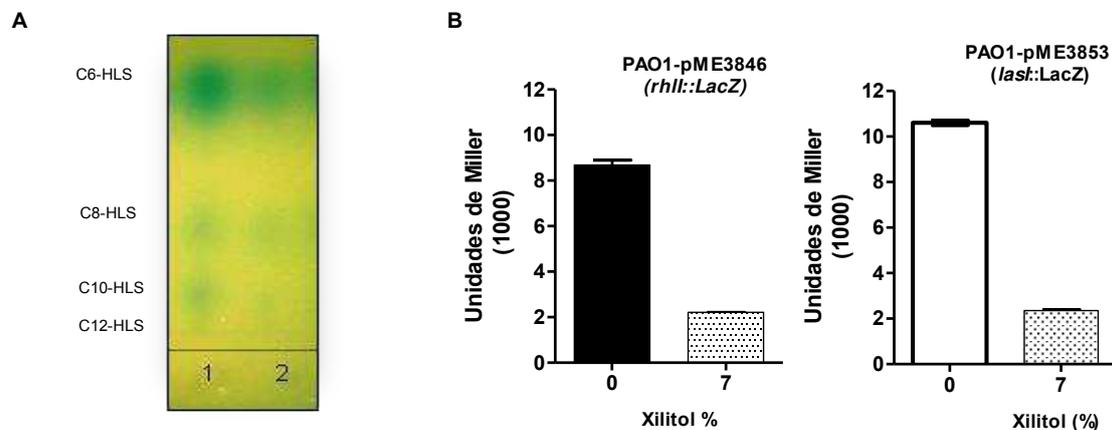


Figura 5.8. Estudio del QS en presencia de xilitol al 7%. Análisis cromatográfico de AHLs (A). Las muestras que contenían las AHLs de PAO1, fueron inoculadas sobre una placa cromatográfica de fase reversa C18 desarrollada con metanol/agua (60:40,v/v). La visualización de las AHLs se realizó empleando la cepa biosensora *A. tumefaciens* NTL4. *P. aeruginosa* PAO1; Spot 1 corresponde a PAO1 control, spot 2 corresponde a PAO1 tratada con xilitol 7% durante toda la noche. **Expresión de los genes *lasI* y *rhlI*(B).** La expresión de los genes de de sintasa de homoserina lactona fueron medidos por β -Gal en los cultivos de PAO1 a las 24 y 48 horas en ausencia (barras negras) o presencia (barras grises) de xilitol 7%, empleando los plásmidos pME3853(*lasI::lacZ*) y pME3846 (*rhlI::lacZ*) Los resultados representan la media \pm DS de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Estos resultados proponen la idea de que el xilitol interfiere en la regulación génica del sistema de QS e inhibiría la expresión de las sintasas de AHLs lo cual explicaría (al menos en parte) la reducción significativa de la producción de factores relacionados con la virulencia de PAO1.

5.8. Efecto del xilitol en la adhesión de *P. aeruginosa* sobre la línea respiratoria Calu-3

5.8.1. Descripción del tipo celular utilizado en el estudio

En los últimos años numerosas investigaciones han dado lugar a la idea que las células del epitelio bronquial funcionan como “barrera” de sustancias y de microorganismos provenientes del exterior, regulando la puesta en marcha y funcionamiento de la proliferación, inflamación y reparación de las vías aéreas tanto en situaciones fisiológicas como en diferentes patologías respiratorias (Proud & Leigh 2011). La posibilidad de cultivar en forma aislada (sin contacto con células inmunes ni de otro tipo) células epiteliales bronquiales de origen humano permite estudiar y comprender mejor los fenómenos relacionados con ellas.

Calu-3 (Figura.5.9.A) es una línea celular de origen humano que presenta una estructura y función muy similar al epitelio bronquial humano normal, tiene gran adherencia y puede crecer en monocapa y también en una interface aire-liquido utilizando filtros permeables para polarización celular (Figura.5.9.B), expresa altos niveles del CFTR y produce un líquido de superficie (ASL) con actividad antimicrobiana. Debido a estas características y otras, es utilizada como modelo en estudios fisiológicos y farmacológicos del epitelio de las vías aéreas (Zhu et al 2010; Stewart Ceri E. 2012; MacVinish LJ 2007; Cantin AM 2006). Se sabe que la estimulación de las Calu-3 con diferentes irritantes o mediadores celulares induce la liberación de radicales libres (productos del stress oxidativo) (Forti et al 2011) y de mediadores de la inflamación como la IL-6 e IL-8 (Sun et al 2008) y por estas características, se la eligió en los sucesivos ensayos a fin de obtener datos que permitan conocer que sucede cuando se expone el epitelio pulmonar a PAO1o a los factores de virulencia liberados por ella, cuando se crece la bacteria en presencia o ausencia de xilitol.

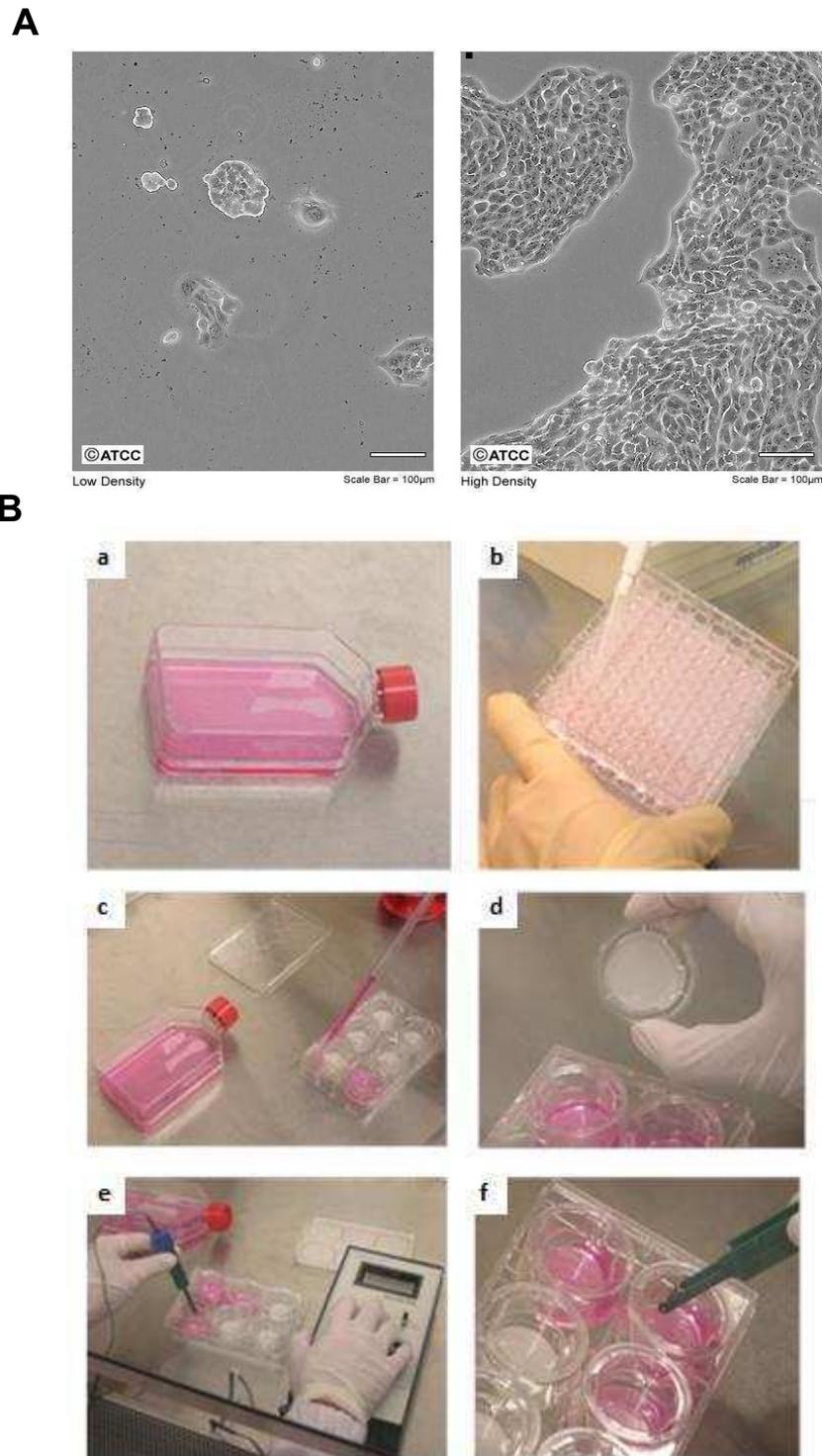


Figura 5.9. Modelo de Epitelio Respiratorio in vitro. (A) Células Calu-3. (a) baja confluencia de células; (b) confluencia media. (B) Crecimiento frascos de cultivo (b), microplacas (c), o en interface interfase aire-liquido (c y d) sobre un inserto o “transwell” simulando cara basal y luminal de los pulmones. Para determinar la viabilidad se emplea un electrodo acoplado a un voltímetro (e) que indica resistencia eléctrica transepitelial generado por la monocapa de células Calu-3. El valor de la resistencia transepitelial indica una mayor confluencia de células. Medición de la resistencia(f).

5.8.2. El tratamiento de PAO1 con xilitol disminuye la adhesión a las células Calu-3

Cuando el epitelio se encuentra dañado, *P. aeruginosa* se une por la cara basolateral de las células. Esta adherencia al tejido del hospedador facilita la colonización y supervivencia del patógeno, representando una etapa esencial en la mayoría de los procesos infecciosos (Jankowska et al 2008). Se ha comprobado que la adhesión de *P. aeruginosa* al epitelio puede originar la muerte de la célula hospedador, permitiendo a la bacteria penetrar la capa de células epiteliales diseminarse por el torrente sanguíneo y colonizar órganos distantes ocasionando severos daños en la salud del hospedador (Bucior I 2012). Para evaluar si PAO1 tenía menor adherencia a Calu-3, se desarrolló el ensayo partiendo de un cultivo crecido toda la noche en LB-xilitol al 7%. La cepa empleada fue PAO1-GFP debido a que se utilizó para cuantificar por fluorescencia las diferencias con el control (sin xilitol). La concentración óptima de Calu-3 empleada fue de 10^6 cells/cm² que luego de 24 no alcanzaba la confluencia y se lograba suficientes espacios libres entre el epitelio formado, para que la bacteria pueda adherirse (Lee A et al 1999).

Al momento de desafiar las células con la bacteria pre-tratada, se empleó medio isotónico Ringer, que favorece la adhesión bacteriana a la cara basolateral de las células epiteliales que si se emplease un medio de cultivo tradicional (Lee et al 1999). La concentración bacteriana empleada para el experimento fue de 10^8 UFC/ml equivalente a 0,1 de D.O 600 nm inoculadas durante una hora. Posterior a ello se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar las bacterias débilmente unidas, e inmediatamente se visualizaron las Calu-3 al microscopio de fluorescencia para evaluar la adherencia. El análisis microscópico determinó que el control (sin xilitol) presentó una gran proporción de bacterias adheridas a la cara basolateral de las células Calu-3 (Figura 5.10.A.a), contrariamente a lo que sucedía con aquellas bacterias que crecieron en presencia de 7% de xilitol (Figura 5.10.A.b). Para este caso la cantidad de bacterias adheridas fue significativamente menor (Figura 5.11.A.b). Esto se corroboró mediante densitometría en donde la fluorescencia emitida por la bacteria se registró empleando el programa ImageJ 1.42 (Figura 5.10.B). Los valores de densidad de fluorescencia media cuantificados para el control fue de 1.320.000 CTCF, mientras que para las tratadas con xilitol fue de 115.000 CTCF, representando un 90% menos de bacterias unidas al epitelio. Estos resultados fueron obtenidos luego de realizar el promedio de 5 campos al azar de cada una de las muestras.

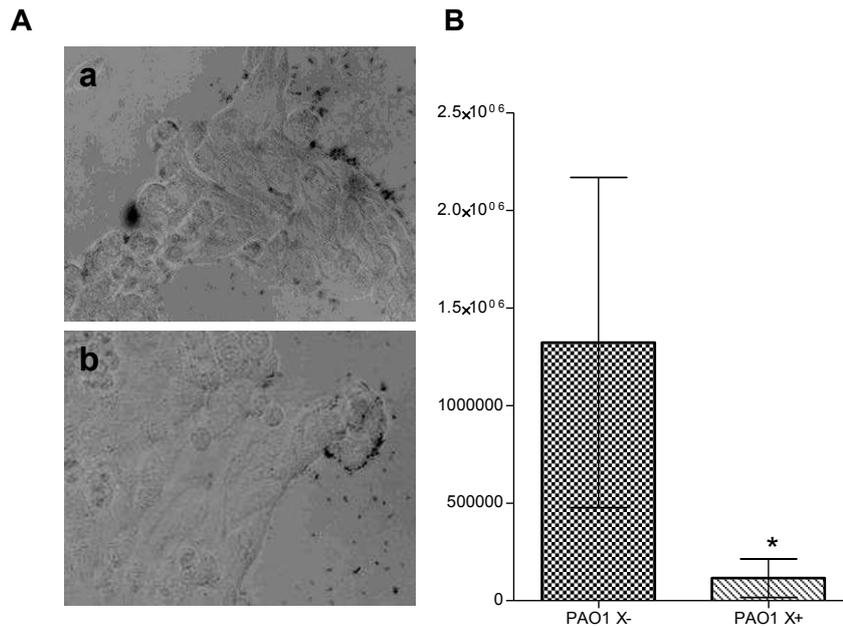


Figura 5.10. Imagen representativa del ensayo de adhesión de PAO1 a epitelio de células Calu-3.

La adherencia de PAO1-GFP (D.O_{600nm} = 0.1) se inspeccionó por microscopía de fluorescencia la cantidad de bacterias adheridas al epitelio producido por Calu-3 y los datos se procesaron mediante el programa ImageJ 1.42. Los datos se expresan como la media ± D.E. de cada una de las los 10 campos observados por muestra * p < 0,05, en comparación con las células tratadas PAO1 sin xilitol.

5.8.3. Efecto del sobrenadante de *P. aeruginosa* sobre la viabilidad celular y de la adhesión de la línea Calu-3.

Las células respiratorias están implicadas en la iniciación y regulación de la respuesta inflamatoria a través de la expresión de citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento (Nakamura et al 1991, Standiford et al 1990). Además, las células expresan todas las isoformas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) (Sherman et al 1999) siendo capaces de producir elevados niveles de óxido nítrico (NO) durante una infección, de modo que el NO posee un rol importante en la defensa del hospedador. Muchas enfermedades inflamatorias pulmonares se asocian con altos niveles de NO y IL-8. Ambos mediadores inflamatorios son quimioattractantes de neutrófilos, y se cree que el aumento del NO incrementa la producción de ARN mensajero de IL-8 desencadenando el inicio de la respuesta inflamatoria (Sparkman & Boggaram 2004). En pacientes con FQ los altos niveles hallados de NO se debe entre otras cosas, a la exposición constante a patógenos. Esto resulta tóxico para las bacterias y necesario para contener la infección, pero al mismo tiempo dañan los tejidos del hospedador ocasionando la liberación de mediadores inflamatorios. En el caso de individuos predispuestos por sus patologías de base, la cascada de mediadores inflamatorios tiende a amplificarse sin control y es probable que este y otros tipos de radicales estén implicados, al menos en parte, en las reacciones inflamatorias en la FQ (Francoeur C 1995).

P. aeruginosa libera diversos factores de virulencia al sobrenadante que como se ha mencionado anteriormente, afecta la fisiología celular del hospedador. A fin de determinar cuan citotóxico resultaba ser el sobrenadante, se expusieron los cultivos de Calu-3 durante 4 horas a distintos porcentajes de los mismos a partiendo de cultivos de PAO1 crecido en presencia o ausencia de sobrenadante(1 % a 50 %) proveniente de un cultivo D.O₆₀₀ crecido o no con 7% de xilitol (ver Materiales y Métodos). La viabilidad se verificó a través del ensayo colorimétrico con sales de tetrazolio(MTS),que permitió inferir a través de la actividad metabólica de oxidasas mitocondriales, la cantidad de células vivas o muertas. Los resultados obtenidos por este método, demostraron que utilizando entre el 1% y 10% de cualquiera de los sobrenadantes tanto control como los de xilitol a distintos porcentajes, las Calu-3 no se encontraban afectadas y la célula continuaba metabólicamente activa. No existieron diferencias significativas para estos valores entre los tratamientos y el control (Figura 5.11.A). Sin embargo, cuando se evaluó a porcentajes mayores, hubo una marcada reducción en la viabilidad celular en dónde a 20% de SN, se redujo un 28%, y al 100% cuando se lo cultivó con 50% de sobrenadante. Paralelamente se realizó una inspección bajo microscopía óptica de cada pocillo Figura 5.11.B. hallándose que con el 20% del sobrenadante proveniente del cultivo sin xilitol, originaba un marcado desprendimiento del epitelio, demostrando que en el sobrenadante se encuentran elementos tóxicos que afectan la adhesión de la monocapa. Por el contrario con el cultivo que fue tratado previamente con xilitol apenas se indujo un desprendimiento hacia los bordes de la placa. Esto indica que el sobrenadante al tener una menor cantidad de factores tóxicos es menos dañino para el epitelio celular comparado con el control.

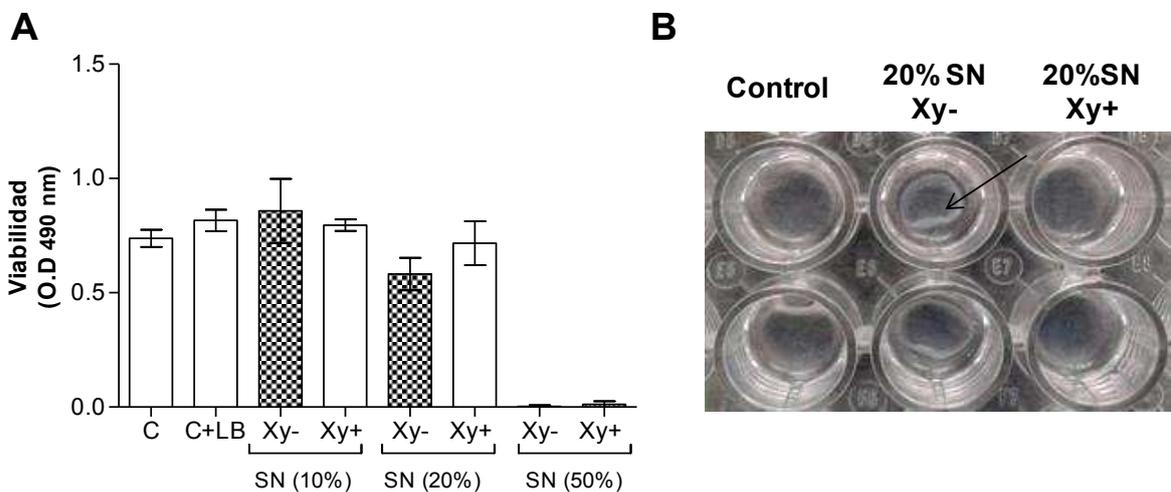


Figura 5.11. Ensayo de viabilidad celular de Calu-3 tratadas con SN de PAO1 por MTS. (A) C, control con medio de cultivo sólo; C+LB, control con LB(50); Xy-, sobrenadante (SN) proveniente de PAO1 crecida sin xilitol (7%), X+ sobrenadante proveniente de PAO1 crecida con xilitol (7%). Los SN provenientes de los cultivos de PAO1 crecidos en presencia o ausencia de xilitol 7% fue adicionado a distintos porcentajes 10%, 20% y 50% al medio de cultivo. **(B)** monocapa desprendida en los pocillos tratados con el SN de PAO1 20% (flecha). En aquellos pocillos tratados con 20% del SN de PAO1 con xilitol 7%(20% SNXy+) la monocapa permaneció más adherida. Cada tratamiento fue realizado por sextuplicado. Se muestra un ensayo representativo de 6 ensayos independientes.

5.8.4. El tratamiento de la cepa PAO1 con Xilitol disminuye la producción de radicales por las células Calu-3

Seguidamente se evaluó la liberación de radicales libres en las células Calu-3 a las que se trató con el sobrenadante de PAO1 procedentes de cultivos bacterianos crecidos bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Esta medición se llevó a cabo debido a los resultados obtenidos del punto anterior dado a que si bien a bajas dosis no existían diferencias significativas en cuanto a la toxicidad, si se halló diferencias en la adhesión de la monocapa. Para la medición de radicales libres se empleó diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA, Invitrogen), un compuesto químico que detecta peróxido de hidrógeno, radicales peroxilo, y aniones peroxinitrito, en células que sufrieron daño oxidativo (Chwa et al 2006). El registro de estos radicales libres se realizó por microscopía de fluorescencia luego de 30 minutos de exposición de las células al sobrenadante, tiempo en el cual se pueden observar daño celular oxidativo y detectar diferencias significativas entre el control y los diferentes tratamientos.

La fluorescencia emitida por las células dañadas se capturó por densitometría a través del software ImageJ 1.42 y se realizó un gráfico a partir de los resultados. La Figura 5.12.A representa la fluorescencia celular total corregida (del inglés, CTCF) en función de los porcentajes (%) de los sobrenadantes empleados obtenidos a través de las imágenes de la Figura 5.12.B. Como se observa en la Figura 5.12.A, con 50% de sobrenadante (50%SN) de PAO1 se obtuvo mayor emisión de fluorescencia (1.300.000 CTCF) que aquellas que fueron tratadas con el 50% del sobrenadante de PAO1 (50%SNXy+), crecidas en presencia de xilitol al 7%, alcanzando 115.000 CTCF ($p < 0,05$) Figura 5.12 B. En cambio con el 10% del SNXy+ y 10% de SN, no se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control ni tampoco con el control con LB.

Esto confirmaría la idea de que el xilitol interfiere en la liberación de factores de virulencia de la bacteria disminuyendo su toxicidad y como consecuencia reduce la liberación de radicales libres en Calu-3. A las dosis menores utilizadas y en el tiempo de incubación empleado no se detectó por este método diferencias entre los tratamientos.

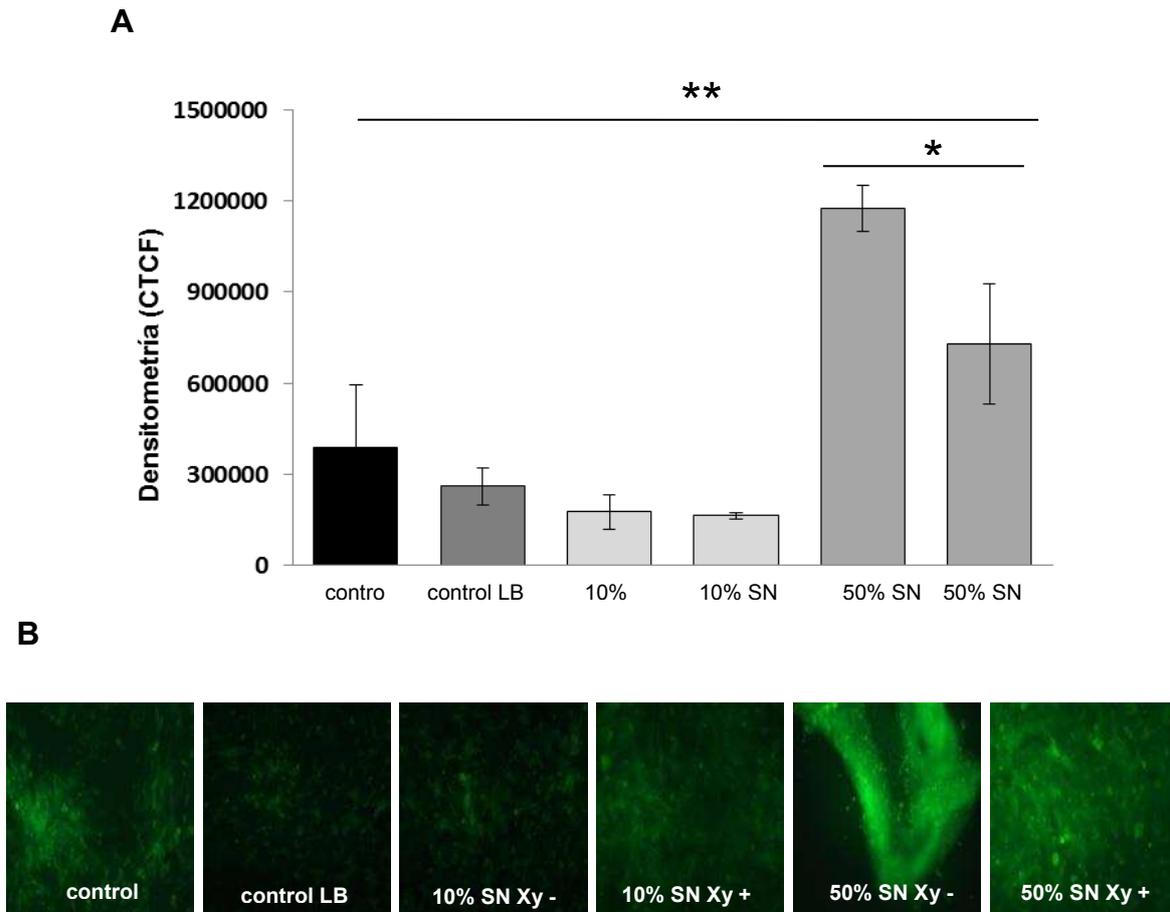


Figura 5.12. Ensayo de producción de ROS por las células Calu-3 en presencia de distintos porcentajes de sobrenadantes de PAO1. Las células se incubaron con sobrenadantes provenientes de cultivos de PAO1 incubados o no con xilitol al 7%, durante 30 minutos, previamente se adicionó diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) por 10 minutos. El exceso de colorante fue removido y las muestras se observaron en el microscopio de fluorescencia (excitación 460–480 nm y emisión at 495–540 nm). Los resultados obtenidos se procesaron con el programa para fluorescencia ImageJ 1.42, obteniéndose la Fluorescencia celular total corregida (del inglés, CTCF). Los datos se expresan como la media \pm D.E. de cada una de las muestras *p <0,05, en comparación con las células tratadas con sobrenadante de PAO1 sin xilitol.

Cuando se analizaron dosis mayores como 50% de sobrenadante, las Calu-3 comenzaron a aglomerarse inmediatamente dentro de los 10 minutos de exposición al agente nocivo y a desprenderse inmediatamente del pocillo de la placa (Figura 5.12.B), indicando un severo daño celular (Figura 5.13.ByD). Sin embargo, el 50% de sobrenadante proveniente del cultivo crecido en presencia de xilitol, la morfología observada era muy similar al control (medio de cultivo sólo) (Figura 5.13.A), con un leve indicio de desprendimiento de los bordes de la mono capa (Figura 5.13.CyD), pero sin presentar el daño generado como en el caso del 50% sobrenadante de PAO1. Nuevamente, el sobrenadante de las bacterias PAO1 tratadas con xilitol resultó menos nocivo a tiempos cortos aun empleando porcentajes altos de

sobrenadante. La disminución en la producción de especies reactivas por las células epiteliales dio como resultado menor toxicidad celular y un menor cambio morfológico de la monocapa de células Calu-3 impidiendo su desprendimiento de la placa compara con el sobrenadante de PAO1 sólo.

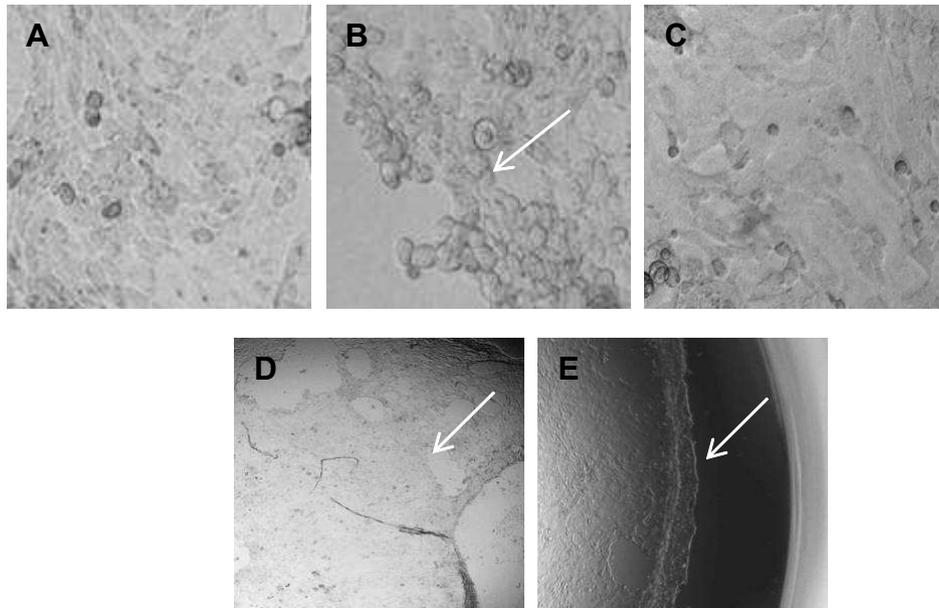


Figura 5.13. Visualización microscópica de la monocapa de células Calu-3 expuestas a 50% de sobrenadante de PAO1. Las Calu-3 expusieron a distintos porcentajes de sobrenadante (SN) de PAO1 en presencia o ausencia de xilitol al 7%. Luego de exponer la monocapa de células con sobrenadante de PAO1 con un microscopio óptico hasta observar alteraciones morfológicas en las células. control (A); 50% SN de PAO1 (B); 50% SN de PAO1 tratado con xilitol 7% (C). Magnificación 40X. Monocapa celular tratadas con 50% SN de PAO1 (D); 50% SN de PAO1 tratado con xilitol 7% (E) Magnificación 10X. La flecha indica daño epitelial. El ensayo fue realizado por triplicado tres veces con resultados similares.

Al mismo tiempo, se evaluó la concentración de nitrito (NO_2^-) producido como consecuencia de la interacción del NO liberado por las células dañadas con el oxígeno. La interacción química entre el NO y el O_2 genera una variedad de óxidos de nitrógeno que al ser muy estables son fácilmente cuantificables en los fluidos biológicos (Xu & Liu 1998) por el método de Griess (ver Materiales y Métodos), resultando en una reacción colorimétrica. La sensibilidad de dicho método para cuantificar nitritos en el sobrenadante de células epiteliales es en el rango de 0-100 μM , y para este caso se pudo observar producción de NO_2^- celular al emplearse porcentajes altos de SN (50%), donde la agresión del sobrenadante de la bacteria sobre las células fue extrema.

Los resultados generados para cada punto se extrapolaron a la curva estándar, obteniéndose una concentración de nitritos de $3,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$ para aquellas células que fueron tratadas con el

SN PAO1 y de $2 \pm 0,3 \mu\text{M}$ para el SN que provenía de un cultivo crecido en presencia de xilitol al 7%. La reducción de NO_2^- en las células que se trataron con los SN de PAO1 con xilitol representa un 33% menos si se lo compara con el SN proveniente de un cultivo únicamente con medio de crecimiento (Figura 5.14. A y B).

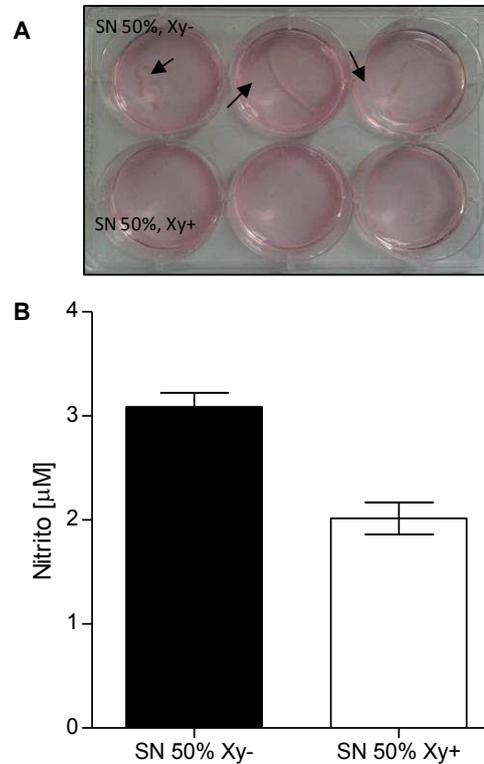


Figura 5.15. Ensayo de producción de NO por las células Calu-3 en presencia de sobrenadantes de PAO1 con y sin xilitol. Las células se incubaron con distintos porcentajes del sobrenadante de PAO1, durante 30 minutos. La concentración de nitritos en el medio de cultivo se determinó mediante la técnica de Griess (A Cuantificación de la producción de NO (B)). Los datos son representativos de 6 experimentos independientes y muestran la media \pm D.E de las muestras por octuplicado. * $p < 0,05$, en comparación con las células tratadas con sobrenadante de PAO1 sin xilitol.

5.8.5. Medición del factor pro-inflamatorio IL-8 en Calu-3 expuestas a sobrenadante de PAO1

P. aeruginosa desencadena en los pulmones de los pacientes con FQ la respuesta inmune innata de las células epiteliales de las vías respiratorias, incluyendo la cadena de señalización celular que conducen a la activación del factor de transcripción NF-kappa B y la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas como IL-8 e IL-1 β (Adamo et al 2004, DiMango et al 1998); (Hybiske et al 2004). Para determinar la liberación de IL-8 se tomaron los sobrenadantes de PAO1 y se los incubó durante 4 horas en un cultivo de Calu-3. (Illek et al 1996).

La dosis empleada fue del 10% de sobrenadante, en la cual no se evidenciaba daño epitelial medido por MTS ni cambios morfológicos en ese período de tiempo, como sucedía por ejemplo

al 20% de SN de PAO1 y a dosis mayores, por lo que permitiría hallar diferencias entre los tratamientos a dosis menores. Además, se contaba con la experiencia previa de que 4 horas, era un tiempo óptimo para permitir la expresión de IL-8. Luego de la incubación con el sobrenadante de PAO1 con o sin xilitol (7%), se removió el medio de cultivo de las células que contenía la citoquina en estudio y se empleó el método de ELISA para detectar IL-8 (Materiales y Métodos).

La Figura 5.16. muestra como la liberación de IL-8 aumentó con respecto al control basal (células con medio de cultivo sólo) para el sobrenadante de PAO1. Este sobrenadante estimuló la producción de la citoquina IL-8, incrementando su liberación 30 ng/ml, 2.3 veces más que el nivel basal que fue de 13 ng/ml. Afortunadamente, el sobrenadante de PAO1 cultivado con xilitol, alcanzó valores similares al control, con una concentración de 17ng/ml. Este resultado indica que el sobrenadante de PAO1 proveniente del cultivo tratado con xilitol al 7%, es menos citotóxico, y reduce significativamente la producción y liberación de IL-8, demostrando que el xilitol torna menos patogénica a *P. aeruginosa* PAO1 por reducción de sus factores de virulencia.

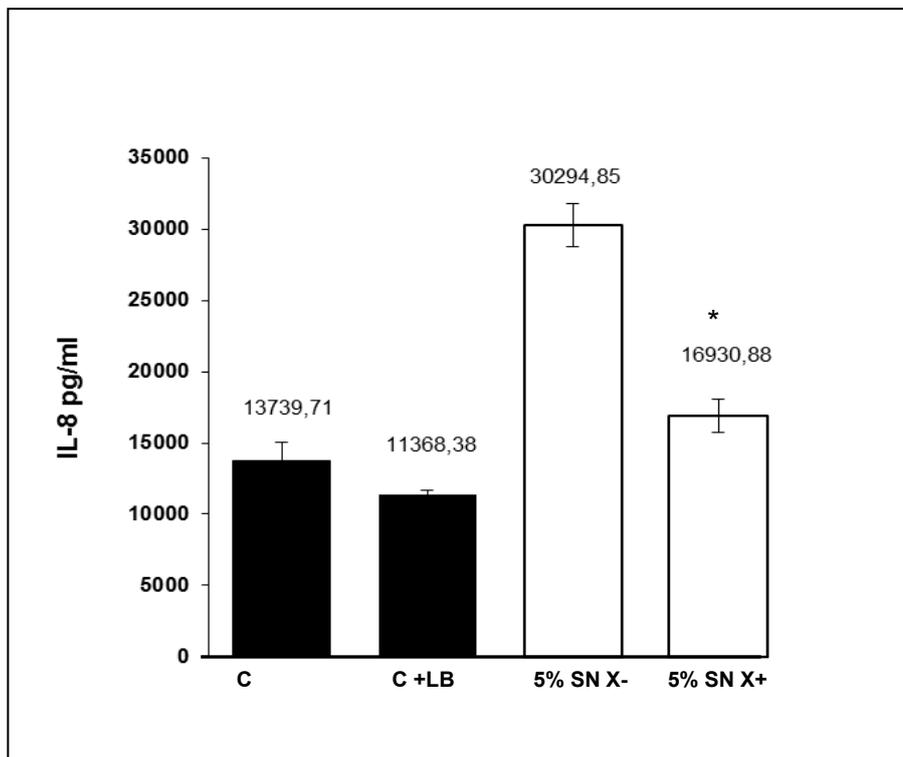


Figura 5.16. Las células fueron tratadas solo con medio de cultivo (C), medio de cultivo y 5% de LB (C+LB), 5% SN de PAO1 (5% SN X-) y 5% de SN de PAO1 tratado con xilitol al 7% (5% SN X+). Luego de 4 h se recogió el medio y se midió la producción de IL-8 por ELISA. El gráfico representa la media de las muestras \pm D.E. representativo de dos ensayos independientes realizados por triplicado con $p \leq 0,001$.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el xilitol posee propiedades antiadherentes y es capaz de reducir la formación de *biofilm* de PAO1. Al modular la expresión de los factores de virulencia de PAO1 ejerce efectos positivos sobre la liberación de mediadores inflamatorios como el NO, radicales libres en general, e IL-8 por parte del epitelio bronquial. Esto permite pensar al xilitol como un potencial agente para el tratamiento de infecciones causada por *P. aeruginosa* y otras bacterias en pacientes con FQ u otras patologías que involucre procesos infecciosos e inflamatorios.

CAPÍTULO VI

6. DISCUSIÓN

En el 2012 la Organización Mundial de la Salud (WHO 2012) se pronunció sobre la necesidad de buscar nuevos medicamentos a base de plantas como fuente de atención primaria de salud para la gran mayoría de la población del mundo, especialmente en los países en vía desarrollo (WHO 2001). Esto refuerza a su vez, la responsabilidad de los científicos a dedicar más atención al reino vegetal.

La mayoría de los agentes antimicrobianos y antiinflamatorios utilizados terapéuticamente son de origen natural y posteriormente se los industrializa para su comercialización. Esto promueve el interés de investigar plantas empleadas en la medicina tradicional o las de consumo diario ya que, los productos naturales, ofrecen una gran diversidad química de compuestos, ocupando un espacio adicional en el campo de la química farmacéutica si se lo compara con aquellos de origen sintético. Varios estudios sugieren que los fitoquímicos de la dieta pueden dar lugar a una nueva categoría de sustancias antimicrobianas que podrían presentar un espectro más amplio de acción, contribuyendo a solucionar el problema de la resistencia a los antibióticos (Mowrey 1990) y a los efectos adversos de los antiinflamatorios convencionales. A su vez se los reconoce como seguros y muy rara vez se les asocia efectos colaterales como ocurre con los medicamentos de uso tradicional (Cowan 1999, Mowrey 1990., Vатtem 2005) por lo que hace que el estudio de compuestos naturales sea válida.

Durante esta tesis de doctorado, los estudios realizados se enfocaron en la búsqueda de compuestos naturales con potencial actividad antimicrobiana y/o anti-inflamatoria sobre *Pseudomonas aeruginosa*, responsable del daño pulmonar crónico y progresivo en paciente con Fibrosis Quística. Por ello en esta sección se analizarán los resultados obtenidos en el estudio de compuestos derivados de plantas como agente antimicrobiano sobre PAO1 y se discutirán sus implicancias sobre la respuesta inflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro* bajo los modelos de inflamación descriptos. Finalmente, se plantearan las perspectivas y la relevancia de estos compuestos como potenciales agentes terapéuticos en pacientes con FQ.

El extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* enriquecido con CA, reduce la viabilidad bacteriana, potencia la acción de los antibióticos y posee propiedades antiinflamatorias.

Durante esta tesis de doctorado, los estudios realizados se enfocaron en la búsqueda de compuestos naturales con potencial actividad antimicrobiana y/o anti-inflamatoria. En la primera parte, se presentaron los resultados obtenidos utilizando un extracto acuoso (RACU) y otro etanólico (RETOH) de hojas frescas de romero en los que se determinó la composición de compuestos fenólicos por HPLC/C-18. Los perfiles para el RETOH, mostraron que este extracto

estaba enriquecido principalmente de CA, y en menor medida de su análogo oxidado el CS (Figura 3.2.C) junto con otros compuestos minoritarios no identificados. El otro compuesto fenólico, el RA, fue identificado como uno de los componentes mayoritarios del RACU (Figura 3.2.B). Al evaluar los extractos como potenciales agentes antimicrobianos sobre *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, se encontró que de los dos, el RETOH presentó mayor actividad antibacteriana debido a que la CIM no superó los 1000 µg/ml (Figura 3.3.A), mientras que para el RACU, la CIM fue superior a 5 mg/ml (Figura 3.3.B) e inclusive a dosis mayores de 10 mg/ml (datos no mostrados). A su vez, el crecimiento se vio significativamente reducido en presencia de CA y CS, en donde ambos redujeron el crecimiento de PAO1 cuando se emplearon concentraciones de 600 y 800 µg/ml, respectivamente (Figura 3.3.C y D). En cuanto a la acción de RA, no se hallaron valores en los cuales el crecimiento haya sido afectado (Figura 3.3 B). Estos resultados demuestran que la acción antimicrobiana observada frente a PAO1 por el REOH corresponde principalmente a CA, el compuesto mayoritario contenido a partir de hojas frescas de romero. Los resultados coinciden con los publicados por Alamer y col (Alamer 2013), donde demostraron por otro método, el de difusión en disco, que el RETOH inhibe el crecimiento de *P. aeruginosa* (Alamer 2013, Genena 2008). A partir de los resultados alcanzados, se buscó determinar que ocurría con la actividad de los compuestos frente aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con FQ, y sobre otras cepas como *B. cepacia*, *S. aureus* y *E coli*, también presentes en estos pacientes. Los resultados logrados fueron similares a los encontrados para PAO1 (Tabla 3.1). Si bien, las determinaciones analíticas se realizaron por métodos distintos, uno en medio líquido y el otro en placas de agar, la correlación en cuanto a efectividad de RETOH, RACU, CA, CS y RA fue la misma en los aislados clínicos que en PAO1, en ambos casos el crecimiento fue inhibido por RETOH, CA y CS. Entre CA y CS, el primero fue más efectivo que CS, debido a que se empleó una menor dosis con respecto a CA para inhibir el crecimiento. Interesantemente la cepa FQres que presentó resistencia antibiótica a los tres antibióticos evaluados, mostró susceptibilidad con CA y CS (Figura 3.4 y Tabla 3.1). Como sucedió con PAO1, el RACU no fue efectivo en ninguna de las cepas aún cuando se emplearon altas dosis del mismo.

Bajo la hipótesis de que la combinación de compuestos provenientes de fuentes naturales, como los que provienen de la dieta, podrían ser una buena estrategia para el tratamiento de infecciones si se los combina con antibióticos (Jayaraman et al 2010, Lewis & Ausubel 2006), se investigó la co-administración de RETOH en dosis subinhibitorias, junto con GEN, TOB y CAZ. Cuando se analizó el efecto del antibiótico sólo, se registró que el crecimiento de PAO1 se redujo de manera significativa para los tres antibióticos empleados. La EC₅₀ fue de 1,75 µg/ml para GEN (Figura 3.5.a); 5 µg/ml para CAZ (Figura 3.5. b); y 1,25 µg/ml para TOB (Figura 3.5.c). Al co-administrar antibiótico junto con RETOH, se produjo una reducción en la EC₅₀ de 1 µg/ml para GEN mientras que para CAZ y TOB el valor se redujo a 0.0625 µg/ml y se mantuvo en ese rango aún a mayores dosis de antibiótico. Esto podría indicar que hay una concentración mínima de RETOH capaz de bloquear la salida del antibiótico y como

consecuencia incrementar la acción del mismo a bajas dosis. Por ello el efecto inhibitorio observado.

Cuando se repitió el experimento con CA junto con TOB se halló el mismo comportamiento observado con RETOH. El crecimiento disminuyó en la fase donde el antibiótico inducía levemente la proliferación bacteriana (0-0,75 $\mu\text{g/ml}$) decreciendo rápidamente y de manera significativa en el rango de 0,50 a 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3.5.d). Interesantemente estos datos concuerdan con los hallados por Horiuchi y col., (Horiuchi et al 2007) en el que demostraron que tanto CA como CS, potencian la acción de los aminoglicósidos en bacterias Gram positivas de manera sinérgica. Los resultados hallados sumado al de los otros grupos permitiría pensar que el empleo de los antibióticos junto con el RETOH o CA reducirían los efectos colaterales asociados a ellos dado a que se requiere una menor dosis de los mismos para que cause el mismo efecto que el antibiótico sólo.

Intentando comprender la acción de estos compuestos naturales, y teniendo en cuenta la importancia de la formación de *biofilm* bacteriano en la resistencia a distintos antibióticos, se estudió que sucedida con este, cuando se incubaba la bacteria en presencia de CA. En el caso del *biofilm* de PAO1 (Figura 3.6.a), la formación de este se redujo 25% con respecto al control, para las 3 dosis empleadas de CA indicando que el efecto es independiente de la concentración utilizada de las tres dosis empleadas. El análisis sobre los aislados clínicos con los resultados fueron variables, ya que en algunos casos no hubo diferencias significativas con el control y en otros se alcanzó una inhibición de hasta un 50% (Figura 3.6.b-e). Estos resultados indicarían que el CA ejerce un efecto sobre la formación de *biofilms* dependiendo de las características particulares de cada cepa.

La susceptibilidad antimicrobiana de PAO1 bajo la estructura de *biofilm*, también fue evaluada cuando se adicionaba TOB (10 $\mu\text{g/ml}$) luego de 24 h de formado el *biofilm* en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de CA. En función de los resultados, se halló que el *biofilm* formada en presencia de CA, es más permeable a TOB ya que cuando se adicionó TOB (10 $\mu\text{g/ml}$) 24 h después al *biofilm* previamente formado (crecido sin CA), éste se redujo en un 35% con respecto al control, mientras que la adición de TOB al cultivo tratado con CA previamente, se redujo en un 67,47%. Esto podría indicar que el *biofilm* que se forma en presencia de CA es estructuralmente distinto al control (sólo), permitiendo el acceso del antibiótico y por lo tanto facilitando la acción bactericida de la TOB (Figura 3.7.). Los valores demuestran que posiblemente el *biofilm* formado en presencia de CA es estructuralmente distinto al control, permitiendo el acceso del antibiótico y por lo tanto facilitando la acción bactericida del mismo, por ello las diferencias encontradas.

Los resultados llevaron al estudio de la motilidad de *P. aeruginosa*, debido a que este fenómeno es necesario para la formación de *biofilm* (O'Toole & Kolter 1998). Los tres tipos de movimientos, *swimming*, *swarming* y *twitching*, fueron desarrollados por PAO1 en ausencia de CA, sin embargo, de los tres, el *swarming* y el *twitching* fueron inhibidos a dosis subinhibitorias de CA (Figura 3.8) mientras que el *swimming* no fue afectado. A su vez se encontró que las bacterias que se encontraban en la periferia bajo el movimiento de *swarming*, eran repelidas

por CA (0,2; 0,5 y 1 μ l partiendo de 4 mg/ml), cuando se inoculaba el compuesto como un punto sobre la placa (Figura 3.9). PAO1 realizó el movimiento característico de *swarming* hacia todas las direcciones y por encima de los discos que contenían únicamente el solvente dónde se diluyó la droga (control) (Figura 3.9.Aa y Ba), mientras que avanzaba en dirección a los discos impregnados con CA pero cambiando la trayectoria de desplazamiento, indicando que CA afecta la motilidad bacteriana (Figura 3.9. A (c-d) y B (c-d)). Lo mismo ocurrió con el *twitching* donde las bacterias eran incapaces de movilizarse a dosis mayores que 0,5 μ g/ml de CA (Figura 3.10). A su vez se encontró que en presencia de CA las bacterias no tenían la capacidad de colonizar otras superficies en presencia de CA (Figura 3.10 Bb), como ocurrió con el control (sin CA) (Figura 3.10Bc) en dónde las bacterias se encontraban esparcidas colonizando nuevas superficies de la placa. Similares resultados fueron hallados para CS, en dónde la motilidad bacteriana fue afectada por este compuesto contrariamente a lo sucedido con RA que no tuvo ningún efecto sobre la bacteria (Figura 3.11.).Analizando la producción de AHLs, y teniendo en cuenta que el QS regula la formación de *biofilm* y la movilidad bacteriana, se observó una clara alteración en la producción de estas, un incremento de las AHLs C4-AHLs, C6-AHLs, C8-AHLs y C12-AHLs. Esta alteración en las AHLs podría deberse a la inhibición o interferencia en el sensado de estas moléculas, alterando su regulación y por ende la motilidad, el *biofilm*, y explicaría la acción potenciadora del CA sobre la tobramicina.

Además de la acción de *R. officinalis*, y sus compuestos bioactivos sobre *P. aeruginosa*, se evaluó la actividad anti-inflamatoria de los mismos. Varios estudios sobre la inflamación sugieren que los daños tisulares se deben en parte la liberación de especies reactivas del oxígeno de los fagocitos que invaden los sitios de inflamación (Cross et al 1987; Winrow et al 1993; Parke et al1996) A su vez, el óxido nítrico también está implicado en la inflamación, cáncer, y otras condiciones patológicas y las interacciones entre el superóxido y el óxido nítrico regulan el tono vascular o la inflamación (Conner et al 1996)Estudios realizados y publicados por nuestro laboratorio, demostraron que los extractos de hojas de romero poseen una importante actividad antioxidante (Moreno S 2006) por lo cual se consideró evaluar su potencial como agente antiinflamatorio dado a que reducen el estrés oxidativo. En base a esa característica se utilizaron modelos *in vivo* e *in vitro* para evaluar dichas propiedades.

Se sabe que tanto el modelo de edema plantar como el auricular inducido con agentes irritantes, se emplean comúnmente para evaluar la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones derivados de ellos. El primer modelo que se empleó fue el de edema plantar inducido con formaldehído al que se le aplicó el extracto etanólico de romero (RETOH) bajo dos formatos: por inyección, tópico o la combinación de ambos. Esto permitió determinar que de los tres la aplicación tópica del RETOH reducía la inflamación en la pata de los ratones (Tabla 4.1. y Figura 4.1.d) en un 80, frente a un 22 o 24% para las otras vías de aplicación. El análisis histopatológico posterior reveló que el tejido que fue inflamado y tratado tópicamente con RETOH tenía una marcada reducción de leucocitos en el sitio de la infección (Figura 4.1 c) con respecto al control con el agente irritante (inflamado) (Figura 4.1 b). Posteriormente se

continuaron los ensayos sobre las orejas de ratón con un éster de forbol, PMA, ya que se conoce que la aplicación tópica de este agente inflamatorio, induce una inflamación cutánea, con edema, hiperplasia epidérmica, sobreproducción de mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1, IL-6 y COX-2, así como especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que provocan estrés oxidativo, el cual amplifica el daño cutáneo inducido por este compuesto (Xian et al 2011; Al-Reza et al 2010) Los compuestos naturales utilizados fueron RETOH, CA, CS y el antiinflamatorio comercial, indometacina. Tras cuatro horas de ocurrida la inflamación se halló que el RETOH redujo la inflamación de manera dosis dependiente (Tabla 4.2.) alcanzando EC₅₀ para 128.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La reducción completa de la inflamación se alcanzó al emplear 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RETOH alcanzando casi el 100% de la inhibición. Cuando se empleó CA y CS mostraron una potente actividad anti-inflamatoria mayor a la obtenida con indometacina, donde los valores fueron 10,2 y 10,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivamente. El valor de EC₅₀ reportado para la indometacina en la literatura es de 93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ por Altinier y col. (Altinier et al 2007), interesantemente, CA y CS mostraron una actividad nueve veces mayor que la indometacina (10.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 10.70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente) si se comparan las EC₅₀ de cada compuesto. En cuanto al extracto etanólico, la efectividad fue menor, un 45% menos efectivo que el compuesto comercial (Tabla 4.2).

Tanto el CA como el CS presentaron una mayor actividad anti-inflamatoria cuando fueron aplicados tópicamente bajo este modelo.

La idea de utilizar tanto de CA como de CS para trastornos inflamatorios sería interesante ya que la potencia conseguida por CA (0,030 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) y CS (0,032 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) fue mayor que la descrita para el ácido ursólico (0,12 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$), el ácido oleanólico (0,29 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) y el ácido micromérico (0,22 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$), obtenidos a partir de hojas secas de romero (Altinier et al 2007). Los efectos del RETOH y CA sobre las orejas de los ratones también fueron confirmados por análisis histopatológicos (Figura 4.2 a-d). El evento inicial del proceso inflamatorio es la infiltración de los neutrófilos en el sitio de la herida, para prevenir así la expansión de la infección mediante la fagocitosis (Barbosa et al 2005). Nuestros resultados sugieren que el RETOH y el CA interfieren con el reclutamiento de PMNL en la sangre en respuesta de una inflamación aguda inducida por formaldehído (Figura 4.1) o PMA (Figura 4.2). Por otra parte, se ha sugerido que se producen altos niveles de NO inducido por iNOS en neutrófilos estimulados (Greenacre et al 2002). Los efectos anti-inflamatorios de los compuestos de diversos orígenes han sido atribuidos a la inhibición de eventos involucrados en la inflamación, como la liberación de histamina, actividad de ciclo-oxigenasa-2,5-lipoxigenasa, actividad de elastasa, activación del complemento, y producción de óxido nítrico (Diaz et al 2000, Honda et al 2000, Huss et al 2002, Kapil & Sharma 1995, Liu et al 1995, Ringbom et al 1998, Ryu et al 2000, Sheng et al 2005, Tamura et al 1998). Además, el NO producido por iNOS ha sido implicado en condiciones patológicas en la piel. La expresión desregulada de iNOS se demostró en biopsias de piel provenientes de pacientes con psoriasis y pacientes con artritis inflamatoria (Kolb-Bachofen et al 1994)(Sakurai et al 1995). Más aún se demostró que NO media las respuestas inflamatorias en keratinocitos humanos (Chung et al 2007). Basado en esto y en los reportes

publicados y el hecho de que NO se encuentra incrementado significativamente durante el proceso de generación del edema en piel de cobayos (Teixeira et al 1993) se ensayo la actividad inhibitoria del RETOH, CA y CS sobre la producción de la producción de NO *in vitro* en macrófagos activados por LPS. Se demostró que los compuestos disminuyeron la producción de NO (Figura 4.3).

Más aún, los resultados demostraron por primera vez *in vivo* que CA and CS decrecieron significativamente la expresión de IL-1 β y TNF- α e inhibieron completamente la expresión de COX-2 (Figura 4.5). Interesantemente, ambos compuestos fueron altamente selectivos en inhibir COX-2 pero no COX-1. Así, demostramos que la selectividad para inhibir COX-2, la cual ha sido reportado para los extractos de romero (Yi & Wetzstein 2010), es debido a los componentes bioactivos, CA y CS, de los extractos. Hasta lo que se conoce, este estudio se demostró *in vivo* la actividad anti-inflamatoria de los compuestos derivados de hojas frescas de romero como lo son CA y CS con una inhibición selectiva de COX-2. Estos resultados sugieren cuán útiles pueden ser estos compuestos como agentes antimicrobianos y anti-inflamatorios en pacientes que padecen infecciones recurrentes como en el caso de la FQ, y como consecuencia respuestas inflamatorias exacerbadas reduciendo los efectos colaterales de los antibióticos y la disminución del uso de drogas esteroideas/no esteroideas convencionales.

Finalmente cabe mencionar que se han realizado estudios clínicos para el tratamiento de infecciones en las vías aéreas superiores en dónde se comparó la eficacia de un aerosol que contenía mezclas de plantas de *Eucalyptus globulus*, *Mentha piperita*, *Origanum syriacum* y *Rosmarinus officinalis* (Ben-Arye, 2011). Este spray nasal demostró tener efecto analgésico y antimicrobiano, alcanzando la mejoría de los pacientes luego de 3 días de tratamiento. Por lo tanto se podría pensar en utilizar estos compuestos no en forma aislada sino como una preparación junto con otros compuestos provenientes de otras plantas aromáticas. La utilización de la medicina complementaria y terapias alternativas, incluida las preparaciones a base de hierbas, podría reducir la prescripción de antibióticos y analgésicos en casos en dónde no existe una única indicación clínica para el tratamiento de la patología como en el caso de la fibrosis quística que necesita un conjunto de tratamientos médicos.

El xilitol disminuye la inflamación causada por PAO1 debido a que inhibe la producción de factores de virulencia regulados por el sistema de *quorum sensing*

A su vez estudió el xilitol, un azúcar alcohol natural con actividad antibacteriana, empleado en la actualidad en la prevención de patologías relacionadas con la colonización bacteriana de fauces y vía aérea superior (caries y otitis media aguda) y ampliamente utilizado en la industria farmacéutica y alimenticia (Azarpazhooh et al 2011, Peldyak & Makinen 2002; Sajjan et al 2004). En base a ello, se hipotetizó sobre la posibilidad de que el xilitol pueda emplearse contra *P. aeruginosa*, ya que coloniza las superficies aéreas relacionadas a estas patologías y a la Fibrosis quística. Las pruebas de actividad antimicrobiana revelaron que de las

concentraciones de xilitol empleadas (0-10%) no afectaron disminuyó el crecimiento de PAO1 (Figura 5.1). Estos resultados junto con los publicados por otros grupos, demuestran que este compuesto no tiene la capacidad microbicida sobre *Pseudomonas. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* (Silva et al 2010 b; Silva et al 2010 b; Silva et al 2011; Silva et al 2007; Söderling et al 2010; Stehling 1999; Tapiainen et al 2001).

Lo interesante de los resultados de viabilidad bacteriana surgió al momento de inspeccionar visualmente los tubos y se encontró que la pigmentación, originada por la piocianina, estaba fuertemente reducida (Figura 5.1.b). La cuantificación se realizó a modo de determinar la cantidad afectada de este agente inflamatorio. Los valores obtenidos demostraron que la reducción era dosis dependiente alcanzando un 50% menos de piocianina liberada al utilizar 10% de xilitol (Figura 5.1.c). Por otra parte, se podía apreciar que el *biofilm* que se forma en la interface líquido-aire en los tubos de ensayo, no se distinguía en aquellos que contenían xilitol. Para determinar si efectivamente el xilitol era capaz de reducir su formación, se reprodujo el ensayo pero en microplacas de poliestireno e interesantemente se halló que efectivamente el *biofilm* estaba reducido en un 50% independientemente de la concentración de xilitol empleada (Figura 5.2. a y b). La capacidad de reducir el *biofilm* por el xilitol también fue observada en cultivos de *Burkholderia cepacia* (Sajjan et al 2004), *Streptococcus pneumoniae* y en menor proporción *Haemophilus influenza* (Kontiokari et al 1995; Söderling & Hietala 2010) hallaron que el 4% de xilitol inhibe la adhesión de seis cepas de estreptococos orales sobre material de vidrio indicando de que podía contribuir a la disminución de la placa dentaria. Acorde a los resultados que se habían determinado hasta ese momento, se prosiguió a determinar si otros factores relacionados con la virulencia estaban afectados, entre ellos enzimas presentes en el sobrenadante de PAO1 y otras específicas como *LasA* y *LasB*. Para las proteasas proveniente de los sobrenadantes tratados con xilitol se observó que la degradación de la caseína era más lenta a medida que se incrementaba la concentración de xilitol con respecto a los cultivos tratados con xilitol sugiriendo que este compuesto afecta la cantidad de enzimas liberadas al sobrenadante de PAO1 o bien su actividad, o ambas (Figura 5.3). En cuanto a *LasB*, la presencia de xilitol en el medio de crecimiento, impidió la degradación de elastina por parte de PAO1 de manera dosis dependiente alcanzando un 100% en la inhibición cuando se empleó 7% de xilitol (Figura 5.4). Sin embargo no se hallaron diferencias para *LasA* con respecto al control (sin xilitol).

Los experimentos continuaron con el estudio del xilitol sobre los distintos movimientos bacterianos ya que están implicados en la adhesión, colonización de superficies y posterior desarrollo de *biofilm*. De los tres movimientos evaluados el *swarming* y el *twitching* quedaron inhibidos por el xilitol (Figura 5.5. y 5.6.). La presencia del xilitol cambió definitivamente la apariencia de las colonias sobre la superficie del agar. En el *swarming* redujo las dendritas características de este tipo de movimiento (Figura 5.5. a-e). Este cambio de la motilidad en PAO1, se reflejó en la producción de ramnolípidos dónde estaba completamente ausente cuando se lo incubó con xilitol (Figura 5.7) ya que la producción de ramnolípidos está

íntimamente ligado al desarrollo de la motilidad de *swarming* (Kohler et al 2000). En cuanto al *twitching* se observó que las bacterias eran capaces de salir de los bordes de la colonia con el fin de colonizar nuevas superficies, mientras que las crecidas en presencia de xilitol no presentaron esa capacidad (Figura 5.7 a-e). Los efectos pleiotrópicos observados del xilitol sobre la producción de factores de virulencia como piocianina, elastasa, LasB, *swarming* y *twitching*, como así también la formación de *biofilm*, sugirió que probablemente la producción de AHLs también estén afectadas debido a que todos los factores patogénicos mencionados se encuentran regulados por el sistema de *quorum sensing*. Para continuar con la investigación, se decidió utilizar xilitol al 7%, siendo la concentración comúnmente adicionada a formulaciones farmacéuticas ya aprobadas por el ANMAT para el tratamiento de patologías respiratorias. Para revelar si el xilitol podía afectar la producción de alguna/s de las AHLs, se realizó una cromatografía de fase reversa de estas moléculas luego de ser extraídas del sobrenadante de PAO1 en presencia o ausencia de xilitol al 7%. El revelado se realizó con la cepa sensora de AHLs, *A. tumefaciens* NTL4 y los resultados mostraron efectivamente que hubo una reducción significativa de C6-AHL, C10-AHL y C12-AHL de PAO1 cuando la bacteria se creció en presencia de xilitol al 7% (Figura 5.8.a). La utilización de la cepa PAO1 transformada con los plásmidos pME3853 (*lasI::LacZ*) y pME3846 (*rhII::lacZ*) nos permitió revelar que la acción del xilitol consistía en interferir en la expresión HSLs sintetas, siendo esta de hasta un 80% aproximadamente. El daño pulmonar que ocurre en la FQ, como las bronquiectasias no FQ, y como en casi todas las enfermedades crónicas de los epitelios, está relacionado al stress oxidativo y a la activación de la cascada de mediadores inflamatorios (Rosanna DP, 2012). La liberación de radicales libres por las células del tejido afectado juega un doble rol: por un lado son tóxicos para las bacterias y en ese sentido fundamentales en la contención de la infección, pero al mismo tiempo dañan los tejidos propios y dan lugar a la liberación de mediadores inflamatorios: en individuos predispuestos por su patologías de base la cascada de mediadores inflamatorios que tiende a amplificarse sin control. Los resultados obtenidos con el uso del xilitol, cuando se co-cultiva PAO1 junto con la línea bronquial Calu-3, alientan el uso tópico del xilitol en pacientes con estas patologías, dado a que se observó que el xilitol afecta a la adherencia al epitelio bronquial, reducido en un 90% con respecto al control (Figura 5.11.a-b). Visto que, *P. aeruginosa* libera diversos factores de virulencia al sobrenadante, y afecta la fisiología celular del hospedador se comprobó que era suficiente un 20% de cualquiera de los sobrenadantes (SN), crecidos o no con xilitol, para comenzar a dañar el epitelio bronquial de acuerdo a los resultados registrados por la técnica de MTS. Sin embargo, por microscopía se observó el epitelio control (20% de SN) comenzaba a desprenderse antes del que había sido coincubado con 20% de SN proveniente del cultivo crecido con xilitol 7% (Figura 5.12.A y B). Estos resultados se deben a que el xilitol afecta la producción de ciertos factores de virulencia, otorgando menor toxicidad a la bacteria y menor daño epitelial.

En base a estos resultados y sabiendo que la activación inflamatoria local se asocia con la generación de un desbalance entre factores dañinos y reparadores por el epitelio pulmonar, y también con el aumento de factores relacionados con la remodelación bronquial (Fischer BM,

2011) algunos autores han postulado que la expansión sistémica del daño oxidativo (radicales peroxilo, nitritos nitratos, etc) debidos a la colonización bacteriana podría ser responsable del deterioro vascular sistémico (Fuschillo S, 2012). El SN que provenía del cultivo tratado con xilitol redujo significativamente el daño oxidativo comparado con el control a tiempos cortos. Lo más notable fue que las Calu-3 en presencia de 50% de SN-7% xilitol, tardó más tiempo en levantar la monocapa de células y generar el daño oxidativo observado por microscopía de fluorescencia en la muestra control, y la reducción en la liberación de NO y de la morfología de la monocapa. Esto demuestra la capacidad que posee indirectamente el xilitol como agente reductor del daño epitelial, debido a que tiene en interferir en la liberación de factores de virulencia de la bacteria (Figura 5.14 y 5.15). Hay estudios en los que se demuestra que las células epiteliales son una importante fuente de IL-8 en FQ, observándose una regulación positiva para la expresión de esta citoquina durante la infección y hallándose en el fluido bronqueo-alveolar de niños con FQ asintomáticos (Armstrong et al., 1995; Cantin, 1995; Khan et al., 1995). Debido a ello se valoró la cantidad de IL-8 liberada por Calu-3 expuesta a 10% de SN control o proveniente de cultivos tratados con xilitol al 7%, dado a que se buscaba hallar diferencias sustanciales entre los SN que no se habían encontrado discrepancias entre viabilidad celular, liberación de radicales libres, adhesión etc. Interesantemente los niveles de IL-8 fueron apenas un 20% más que el control basal (sin SN), 13740 pg/ml frente a 16900 pg/ml, mientras que la tratada con el 10% de SN sólo, produjo el doble de concentración de IL-8 (Figura 5.16).

Los beneficios que se han hallado hasta el momento con xilitol empleando sobrenadantes de cultivo de PAO1 es de particular interés. Dado a que la vía aérea ofrece la particularidad de que todo el epitelio está embebido en el líquido superficial (ASL) y sirve de vehículo para la difusión de factores de protección (lisozima, inmunoglobulinas, etc), puede también ser vehículo de factores de virulencia que induzcan daño celular aún sin presencia de las bacterias. La disminución de la liberación de ese tipo de factores nocivos por las bacterias tratadas con xilitol, y la comprobación de que esto da lugar a una disminución del daño oxidativo y de la respuesta inflamatoria por las células epiteliales, resulta de importancia para el desarrollo de tratamientos para las patologías que asocian infección crónica por *P. aeruginosa* con daño oxidativo e inflamación. Estudios con este compuesto han sido descrito en cuanto a la inocuidad del tratamiento con xilitol nebulizado tanto en individuos sanos como en pacientes con FQ (Durairaj et al 2004, Durairaj et al 2007). Seguramente serán necesarios estudios clínicos para definir si los efectos observados *in vitro* se traducen en mejoras clínicas en la evolución de la salud de los pacientes.

CAPÍTULO VII

- Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 30: 627-34
- Adonizio AL, Downum K, Bennett BC, Mathee K. 2006. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J Ethnopharmacol* 105: 427-35
- Aitken ML, Burke W, McDonald G, Shak S, Montgomery AB, Smith A. 1992. Recombinant human DNase inhalation in normal subjects and patients with cystic fibrosis. A phase 1 study. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 267: 1947-51
- Al-Reza SM, Yoon JI, Kim HJ, Kim JS, Kang SC. 2010. Anti-inflammatory activity of seed essential oil from *Zizyphus jujuba*. *Food and Chemical Toxicology*. 48(2):639-43.
- Al-Bakri AG, Othman G, Afifi FU. Determination of the antibiofilm, antiadhesive, and anti-MRSA activities of seven *Salvia* species. *Pharmacogn Mag* 6: 264-70
- al-Sereiti MR, Abu-Amer KM, Sen P. 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian J Exp Biol* 37: 124-30
- Alnamer R. 2013. In vitro antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* methanolic and aqueous extracts. *Int J Pharm* 3: 1-6
- Altinier G, Sosa S, Aquino RP, Mencherini T, Della Loggia R, Tubaro A. 2007. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of agricultural and food chemistry* 55: 1718-23
- Ammons MC WL, Fisher ST, Wolcott RD, James GA. 2009. In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol. *International journal of antimicrobial agents* 33: 230-6
- Armstrong D. S., Grimwood K., Carzino R., Carlin J. B., Olinsky A., and Phelan P. D. 1995. Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ*. 17; 310(6994): 1571–1572.
- Anderson DJ, Miller B, Marfatia R, Drew R. 2012. Ability of an antibiogram to predict *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to targeted antimicrobials based on hospital day of isolation. *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 33: 589-93
- Anderson MP, Rich DP, Gregory RJ, Smith AE, Welsh MJ. 1991. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251: 679-82
- Andrews JH, Harris RF. 2000. The Ecology and Biogeography of Microorganisms on Plant Surfaces. *Annu Rev Phytopathol* 38: 145-80
- Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect Immun* 66: 1000-7
- Autio JT. 2002. Effect of xylitol chewing gum on salivary *Streptococcus mutans* in preschool children. *ASDC journal of dentistry for children* 69: 81-6, 13
- Azarpazhooh A, Limeback H, Lawrence HP, Shah PS. 2011. Xylitol for preventing acute otitis media in children up to 12 years of age. *The Cochrane database of systematic reviews*: CD007095

- Barbosa PS, Martins AM, Havt A, Toyama DO, Evangelista JS, et al. 2005. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 46: 376-86
- Bauer KA1, West JE, O'Brien JM, Goff DA. Extended-Infusion Cefepime Reduces Mortality in Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Infections 1996. *Infect Dis Clin North Am.* 10(2):297-325.
- Beal R, and W. B. Betts. 2000. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas*. *J. Appl. Microbiol.* 89
- Berk RS, Brown D, Coutinho I, Meyers D. 1987. In vivo studies with two phospholipase C fractions from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 55: 1728-30
- Bergen GA, Shelhamer JH. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. 1996. *Infect Dis Clin North Am.* 10(2):297-325.
- Ben-Arye E1, Dudai N, Eini A, Torem M, Schiff E, Rakover Y. 2011. Treatment of upper respiratory tract infections in primary care: a randomized study using aromatic herbs. *Evid Based Complement Alternat Med.*;2011:690346.
- Bloemberg GV, O'Toole GA, Lugtenberg BJ, Kolter R. 1997. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol* 63: 4543-51
- Bonfield TL, Konstan MW, Burfeind P, Panuska JR, Hilliard JB, Berger M. 1995a. Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 13: 257-61
- Bonfield TL, Panuska JR, Konstan MW, Hilliard KA, Hilliard JB, et al. 1995b. Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152: 2111-8
- Borot F, Vieu DL, Faure G, Fritsch J, Colas J, et al. 2009. Eicosanoid release is increased by membrane destabilization and CFTR inhibition in Calu-3 cells. *PloS one* 4: e7116
- Boussaada O, Ammar S, Saidana D, Chriaa J, Chraif I, et al. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile components from capitula and aerial parts of *Rhaponticum acaule* DC growing wild in Tunisia. *Microbiol Res* 163: 87-95
- Bradbury NA. 1999. Intracellular CFTR: localization and function. *Physiological reviews* 79: S175-91
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54
- Bralley EE, Greenspan P, Hargrove JL, Wicker L, Hartle DK. Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation. 2008. *J Inflamm (Lond)*. 8;5:1.
- Bravo L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* 56: 317-33
- Britigan BE, Railsback MA, Cox CD. 1999. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates alpha1 protease inhibitor: implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infect Immun* 67: 1207-12

- Brown CL, Graham SM, Cable BB, Ozer EA, Taft PJ, Zabner J. 2004. Xylitol enhances bacterial killing in the rabbit maxillary sinus. *Laryngoscope* 114: 2021-4
- Brown CLG, S. M.Cable, B. B.Ozer, E. A.Taft, P. J.Zabner, J. 2004. Xylitol enhances bacterial killing in the rabbit maxillary sinus. *Laryngoscope* 114: 2021-4
- Bucior I PJ, Engel JN. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* Pili and Flagella Mediate Distinct Binding and Signaling Events at the Apical and Basolateral Surface of Airway Epithelium. *PLoS Pathog.* 8: 1-18
- Caiazza NC, O'Toole GA. 2004. SadB is required for the transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* 186: 4476-85
- Camara M, Williams P, Hardman A. 2002. Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. *The Lancet infectious diseases* 2: 667-76
- Campos-Garcia J, Caro AD, Najera R, Miller-Maier RM, Al-Tahhan RA, Soberon-Chavez G. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG gene encodes an NADPH-dependent beta-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. *J Bacteriol* 180: 4442-51
- Camps Rubiol T VGF, Fernández Méndez M y Jiménez San Emeterio J. 1999. Tratamiento de la otitis media aguda en la infancia. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 23: 60-64
- Cantin AM, Hanrahan JW, HJ, Bilodeau G, Ellis L, Dupuis A, Liao J, Zielenski J, Durie P. 2006 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function Is Suppressed in Cigarette Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 173: 1139-44.
- CFF. 2011. Cystic Fibrosis Foundation patient registry, annual data report
- Ciragil P, Soyletir G. 2004. Alginate, elastase and alkaline protease production of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various body sites. *Mikrobiyoloji bulteni* 38: 341-7
- CLSS. 2001. National Committee for Clinical Laboratory Standards. "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing". 11th International Supplement; MS100-S11. Wayne, PA: NCCLS.
- Coburn J WR, Iglewski BH, Gill DM. 1989 Several GTP-binding proteins, including p21c-H-ras, are preferred substrates of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme. *J Biol Chem* May 25: 9004-08
- Collins FS. 1992. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 256: 774-9
- Conner EM, Grisham MB. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition.* 1996;12:274-7
- Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, et al. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol* 184: 3027-33
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711-45
- Cowan MM. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12: 564-82.

- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human diseases. *Ann Intern Med.* 1987;107:526–45.
- Cuvelier ME RH, Berset C 1996. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J Am Oil Chem Soc* 73 645-52
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK. 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* 11: 1119-29
- Chan MM, Ho CT, Huang HI. 1995. Effects of three dietary phytochemicals from tea, rosemary and turmeric on inflammation-induced nitrite production. *Cancer Lett* 96: 23-9
- Chipault JR MG, Hawkins JM, Lundberg WO. 1952. The antioxidant properties of natural spices. *Journal of Food Science* 17: 46-55
- Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP. 2004. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3587-90
- Chung WY, Park JH, Kim MJ, Kim HO, Hwang JK, et al. 2007. Xanthorrhizol inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced acute inflammation and two-stage mouse skin carcinogenesis by blocking the expression of ornithine decarboxylase, cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase through mitogen-activated protein kinases and/or the nuclear factor-kappa B. *Carcinogenesis* 28: 1224-31
- Chwa M, Atilano SR, Reddy V, Jordan N, Kim DW, Kenney MC. 2006. Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. *Investigative ophthalmology & visual science* 47: 1902-10
- D'Argenio DAG, L. A.; Berg,C.A. and Manoil C. 2001 *Drosophila* as a Model Host for *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *J. Bacteriol.* 183 1466-71
- d'Argenio. 2004. The pathogenic lifestyle of *Pseudomonas aeruginosa* in model systems of virulence. In: *Pseudomonas* Volume 2 edited by Ramos J. L., Kluwer Academic/Plenum Publishers New york.
- Dacheux D, Toussaint B, Richard M, Brochier G, Croize J, Attree I. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun* 68: 2916-24
- Dahiya P, Purkayastha S. 2012. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Against Multi-drug Resistant Bacteria from Clinical Isolates. *Indian journal of pharmaceutical sciences* 74: 443-50
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-8
- Davis P. 1999 *Clinical Pathophysiology and Manifestations of Lung Disease*. Philadelphia. In *Cystic Fibrosis in Adults*. ed. Knowles Jyam, pp. 45-67. Lippincott- Raven,
- De-Eknamkul W, Ellis BE. 1984. Rosmarinic acid production and growth characteristics of *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. *Planta Med* 50: 346-50

- de Bentzmann S, Roger P, Dupuit F, Bajolet-Laudinat O, Fuchey C, et al. 1996. Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 64: 1582-8
- de Kievit TR, Iglewski BH. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun* 68: 4839-49
- Dekimpe V, Deziel E. 2009. Revisiting the quorum-sensing hierarchy in *Pseudomonas aeruginosa*: the transcriptional regulator RhlR regulates LasR-specific factors. *Microbiology* 155: 712-23
- Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H, Saar S, Isaac O. 1994. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med* 60: 516-20
- Diaz AM, Abad MJ, Fernandez L, Recuero C, Villaescusa L, et al. 2000. In vitro anti-inflammatory activity of iridoids and triterpenoid compounds isolated from *Phillyrea latifolia* L. *Biol Pharm Bull* 23: 1307-13
- Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Camara M. 2002. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol* 184: 2576-86
- DiMango E, Ratner AJ, Bryan R, Tabibi S, Prince A. 1998. Activation of NF-kappaB by adherent *Pseudomonas aeruginosa* in normal and cystic fibrosis respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 101: 2598-605
- DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A. 1995. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest* 96: 2204-10
- Dixon RA. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411: 843-7
- Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature* 411: 813-7
- Drake D, Montie TC. 1988. Flagella, motility and invasive virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 134: 43-52
- Drenkard E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 5: 1213-9
- Durairaj L, Launspach J, Watt JL, Businga TR, Kline JN, et al. 2004. Safety assessment of inhaled xylitol in mice and healthy volunteers. *Respiratory research* 5: 13
- Durairaj L, Launspach J, Watt JL, Mohamad Z, Kline J, Zabner J. 2007. Safety assessment of inhaled xylitol in subjects with cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 6: 31-4
- Eggermont E. 1996. Gastrointestinal manifestations in cystic fibrosis. *European journal of gastroenterology & hepatology* 8: 731-8
- Englberger W, Hadding U, Etschenberg E, Graf E, Leyck S, et al. 1988. Rosmarinic acid: a new inhibitor of complement C3-convertase with anti-inflammatory activity. *Int J Immunopharmacol* 10: 729-37

- Erenmemisoglu A SR, Ustun H. 1997 Effect of *Rosmarinus officinalis* leaves extract on plasma glucose levels in normoglycaemic and diabetic mice. *Pharmazie* 52: 645-46
- Fátima FPA. 2009. Literature Review: Use of Xylitol for Prevention of Acute Otitis Media. *Intl. Arch. Otorhinolaryngol* 13: 87-92
- Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, et al. 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun* 66: 43-51
- Fernandez-Lopez J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Perez-Alvarez JA, Kuri V. 2005. Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Sci* 69: 371-80
- Ferreira AS, Barbosa, N.R., Júnior, D.R. and Silva, S.S. 2009 In vitro mechanism of xylitol action against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. . *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* ed. Mendez-Vilas, A. Seville: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, pp. 505-509.
- Finck-Barbancon V, Yahr TL, Frank DW. 1998. Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J Bacteriol* 180: 6224-31
- Fischer BM, Pavlisko E, Voynow JA. 2011. Pathogenic triad in COPD: oxidative stress, protease-antiprotease imbalance, and inflammation. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 6:413-21.
- Forti E, Salovaara S, Cetin Y, Bulgheroni A, Tessadri R, et al. 2011. In vitro evaluation of the toxicity induced by nickel soluble and particulate forms in human airway epithelial cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 25: 454-61
- Francoeur C DM. 1995. Nitric oxide and interleukin-8 as inflammatory components of cystic fibrosis. *Inflammation.* 19: 587-98.
- Frizzell, R. A and Pilewski, J. M. 2004 Finally, mice with CF lung disease *Nat Med* 10 452-4.
- Fuqua C, Greenberg EP. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* 3: 685-95
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176: 269-75
- Fuschillo S, Martucci M, Donner CF, Balzano G. 2012. Airway bacterial colonization: the missing link between COPD and cardiovascular events? *Respir Med.* 106(7):915-23.
- Galloway DR. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol Microbiol* 5: 2315-21
- Gao M, Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD. 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol Plant Microbe Interact* 16: 827-34
- Ghafoor, A., Hay, I. D., Rehm, B. H. 2011 Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture *Appl Environ Microbiol* 77 5238-46
- Genena AKH, H.; Smania, A.; Machado de Souza, S. 2008. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas* 28: 463-69

- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168: 918-51
- Gilboa-Garber N. 1996. Towards anti-Pseudomonas aeruginosa adhesion therapy. *Advances in experimental medicine and biology* 408: 39-50
- Gilmore TD. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25: 6680-4
- Gilligan PH. 1991. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 4: 35-51
- Givskov M, de Nys R, Manefield M, Gram L, Maximilien R, et al. 1996. Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol* 178: 6618-22
- Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. 1997. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88: 553-60
- Goma G, A. Pareilleux, and G. Durand 1973. Specific hydrocarbon solubilization during growth of *Candida lipolytica*. *J. Ferment. Technol* 51: 616-18
- Gondim L SJ, Antila M, Sih T. . 2005. Xylitol release pacifier in the prevention of acute otitis media. In: Lim DJ, Bluestone CD, Casselbrant MT. Recent Advances in Otitis Media (Proceedings of the Eighth International Symposium Ontario, Canada). 143-5
- Gonzalez-Guerrico AM, Cafferata EG, Radrizzani M, Marcucci F, Gruenert D, et al. 2002. Tyrosine kinase c-Src constitutes a bridge between cystic fibrosis transmembrane regulator channel failure and MUC1 overexpression in cystic fibrosis. *J Biol Chem* 277: 17239-47
- Goodman A HJ, Limbird L. . 2001. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10a. Sección IV Ed. Mc Graw Hill. New York.: 697 - 742
- Govan JR, Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60: 539-74
- Grebe TA, Doane WW, Richter SF, Clericuzio C, Norman RA, et al. 1992. Mutation analysis of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in Native American populations of the southwest. *American journal of human genetics* 51: 736-40
- Greenacre SA, Rocha FA, Rawlingson A, Meinerikandathevan S, Poston RN, et al. 2002. Protein nitration in cutaneous inflammation in the rat: essential role of inducible nitric oxide synthase and polymorphonuclear leukocytes. *British journal of pharmacology* 136: 985-94
- Greenberg EP. 2003. Bacterial communication: tiny teamwork. *Nature* 424: 134
- Guadarrama S, Pulcini E, Broadaway SC, Pyle BH. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* growth and production of Exotoxin A in static and modeled microgravity environments. *Gravitational and space biology bulletin : publication of the American Society for Gravitational and Space Biology* 18: 85-6
- Guggino WB. 1999. Cystic fibrosis and the salt controversy. *Cell* 96: 607-10

- Hahn HP. 1997. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* 11: (1):99-108.
- Hallborn J, Walfridsson M, Airaksinen U, Ojamo H, Hahn-Hagerdal B, et al. 1991. Xylitol production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology (N Y)* 9: 1090-5
- Hamosh A, FitzSimmons SC, Macek M, Jr., Knowles MR, Rosenstein BJ, Cutting GR. 1998. Comparison of the clinical manifestations of cystic fibrosis in black and white patients. *The Journal of pediatrics* 132: 255-9
- Hartman G, Wise R. 1998. Quorum sensing: potential means of treating gram-negative infections? *Lancet* 351: 848-9
- Hassett DJ, Ma JF, Elkins JG, McDermott TR, Ochsner UA, et al. 1999. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol* 34: 1082-93
- Hastie AT, S. T. Hingley, M. L. Higgins, F. Kueppers, and T. Shryock. . 1986. Rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* inactivates mammalian tracheal ciliary axonemes. *Cell Motility Cytoskeleton* 6: 502-09
- Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV. 2008. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65: 1631-52
- Hauser AR, Kang PJ, Engel JN. 1998. PepA, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol Microbiol* 27: 807-18
- Hauser G, and M. L. Karnovsky 1957. Rhamnose and rhamnolipid biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 224: 91-105
- Heck LW, Morihara K, McRae WB, Miller EJ. 1986. Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* 51: 115-8
- Hellewell PG, Jose PJ, Williams TJ. 1992. Inflammatory mechanisms in the passive cutaneous anaphylactic reaction in the rabbit: evidence that novel mediators are involved. *British journal of pharmacology* 107: 1163-72
- Hentzer M, Givskov M. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 112: 1300-7
- Hentzer M, M. Givskov, and L. Eberl. . 2004. Quorum sensing in biofilms: gossip in slime city?, . O'Toole and M. A. Ghannoum (ed.), *Microbial biofilms*. ASM Press, Washington, D.C.: 118-40. In G.
- Hentzer M, Riedel K, Rasmussen TB, Heydorn A, Andersen JB, Parsek MR, Rice SA, Eberl L, Molin S, Høiby N, Kjelleberg S, Givskov M. 2002 Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology*. 148(Pt 1):87-102.
- Holloway BW. 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 13: 572-81
- Honda T, Gribble GW, Suh N, Finlay HJ, Rounds BV, et al. 2000. Novel synthetic oleanane and ursane triterpenoids with various enone functionalities in ring A as inhibitors of nitric oxide production in mouse macrophages. *J Med Chem* 43: 1866-77

- Hong YQ, Ghebrehiwet B. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3 1992 *Clin Immunol Immunopathol.* 62(2):133-8.
- Horiuchi K, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Tsuchiya T. 2007. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis*. *Biol Pharm Bull* 30: 287-90
- Hubbard RC, McElvaney NG, Birrer P, Shak S, Robinson WW, et al. 1992. A preliminary study of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease I in the treatment of cystic fibrosis. *The New England journal of medicine* 326: 812-5
- Huss U, Ringbom T, Perera P, Bohlin L, Vasange M. 2002. Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay. *Journal of natural products* 65: 1517-21
- Hybiske K, Ichikawa JK, Huang V, Lory SJ, Machen TE. 2004. Cystic fibrosis airway epithelial cell polarity and bacterial flagellin determine host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Cellular microbiology* 6: 49-63
- Illek B, Fischer H, Machen TE. 1996. Alternate stimulation of apical CFTR by genistein in epithelia. *Am J Physiol* 270: C265-75
- Ichikawa, D., Matsui, A., Imai, M., Sonoda, Y. & Kasahara, T. (2004). Effect of various catechins on the IL-12p40 production by murine peritoneal macrophages and a macrophage cell line, J774.1. *Biol Pharm Bull*, 27,9:1353-1358.
- Inoue KT, H. Shiga, A. Fujita, Y. Makino, H. Yanagisawa, R. Ichinose, T. Kato, Y. Yamada, T. Yoshikawa, T. 2005. Effects of volatile constituents of a rosemary extract on allergic airway inflammation related to house dust mite allergen in mice. *Int J Mol Med* 16: 315-9
- Jaffar-Bandjee MC, Lazdunski A, Bally M, Carrere J, Chazalotte JP, Galabert C. 1995. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology* 33: 924-9
- Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. 2008. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2008: 357964
- Jayaraman P, Sakharkar MK, Lim CS, Tang TH, Sakharkar KR. 2010. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *International journal of biological sciences* 6: 556-68
- Jewes LA, Spencer RC. 1990. The incidence of anaerobes in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Journal of medical microbiology* 31: 271-4
- Jimenez PN, Koch G, Thompson JA, Xavier KB, Cool RH, Quax WJ. 2012. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 76: 46-65
- Kapil A, Sharma S. 1995. Effect of oleanolic acid on complement in adjuvant- and carrageenan-induced inflammation in rats. *J Pharm Pharmacol* 47: 585-7

- Karadzic I, Masui A, Fujiwara N. 2004. Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* grown in cutting oil. *Journal of bioscience and bioengineering* 98: 145-52
- Kessler E, Safrin M, Abrams WR, Rosenbloom J, Ohman DE. 1997. Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J Biol Chem* 272: 9884-9
- Khan TZ, Wagener JS, Bost T, Martinez J, Accurso FJ, Riches DW. 1995. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 151: 1075-82
- Khan S, Misra AK, Tripathi CK, Mishra BN, Bihari V. 2006. Response surface optimization of effective medium constituents for the production of alkaline protease from a newly isolated strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J Exp Biol*.44(2):151-6.
- Khalifa B. H.; Moissenet D., Vu Thien H., Khedher M. Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* 2011 *Ann Biol Clin*; 69 (4) : 393-403
- Kim KC, Nassiri J, Brody JS. 1989. Mechanisms of airway goblet cell mucin release: studies with cultured tracheal surface epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 1: 137-43
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et maladies infectieuses* 36: 78-91
- Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM. 2004. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European journal of pharmacology* 500: 255-66
- Koch C, Hoiby N. 1993. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341: 1065-9
- Kohler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechere JC. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 182: 5990-6
- Kohler W. 2000. Zentralblatt fur Bakteriologie--100 years ago: evidence for a haemolysin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of medical microbiology : IJMM* 290: 205-6
- Kolb-Bachofen V, Fehsel K, Michel G, Ruzicka T. 1994. Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris. *Lancet* 344: 139
- Kong AN, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. 2000. Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis. *Archives of pharmacal research* 23: 1-16
- Konstan MW, Hilliard KA, Norvell TM, Berger M. 1994. Bronchoalveolar lavage findings in cystic fibrosis patients with stable, clinically mild lung disease suggest ongoing infection and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 150: 448-54
- Konstan MW. Therapies aimed at airway inflammation in cystic fibrosis. 1998. *Clin Chest Med*. 19(3):505-13, vi. Review.
- Kontiokari T, Uhari M, Koskela M. 1998. Antiadhesive effects of xylitol on otopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 41: 563-5
- Kontiokari TU, M. Koskela, M. 1995. Effect of xylitol on growth of nasopharyngeal bacteria in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1820-3

- Kownatzki R, B. Tummler, and G. Doring. 1987. Rhamnolipid of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients. *Lancet* 1: 1026-27
- Krauss RD, Berta G, Rado TA, Bubien JK. 1992. Antisense oligonucleotides to CFTR confer a cystic fibrosis phenotype on B lymphocytes. *Am J Physiol* 263: C1147-51
- Kültür S. 2007. Medicinal plants used in Kirklareli Province (Turkey). *J Ethnopharmacol.* 111(2): 341-64
- Lamont IL, Beare PA, Ochsner U, Vasil AI, Vasil ML. 2002. Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonasaeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 7072-7
- Latifi A, Foglino M, Tanaka K, Williams P, Lazdunski A. 1996. A hierarchical quorum-sensing cascade in *Pseudomonas aeruginosa* links the transcriptional activators LasR and RhIR (VsmR) to expression of the stationary-phase sigma factor RpoS. *Mol Microbiol* 21: 1137-46
- Latifi A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GS, et al. 1995. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* 17: 333-43
- Lazdunski AM, Ventre I, Sturgis JN. 2004. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nature reviews. Microbiology* 2: 581-92
- Lee A, Chow D, Haus B, Tseng W, Evans D, et al. 1999. Airway epithelial tight junctions and binding and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol* 277: L204-17
- Leigh M. 1999 Airways Secretions. In *Cystic Fibrosis in Adults. ed. In Knowlws Jyam. Lippincott-Raven, Philadelphia.*
- Lewis K, Ausubel FM. 2006. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature biotechnology* 24: 1504-7
- Lillehoj EP, Kim BT, Kim KC. 2002. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282: L751-6
- Lindhout T, Lau PC, Brewer D, Lam JS. 2009. Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology* 155: 3449-60
- Littlewood JM, Smye SW, Cunliffe H. 1993. Aerosol antibiotic treatment in cystic fibrosis. *Archives of disease in childhood* 68: 788-92
- Liu J, Liu Y, Parkinson A, Klaassen CD. 1995. Effect of oleanolic acid on hepatic toxicant-activating and detoxifying systems in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 275: 768-74
- Liu PV. 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 130 Suppl: S94-9
- Lo AH, Liang YC, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor-kappaB in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 23: 983-91

- Lowe N, Gan HM, Chakravartty V, Scott R, Szegedi E, et al. 2009. Quorum-sensing signal production by *Agrobacterium vitis* strains and their tumor-inducing and tartrate-catabolic plasmids. *FEMS microbiology letters* 296: 102-9
- Luo H, Hu Q, Nelson K, Longo C, Kausch AP, et al. 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera* L.) transformation using phosphinothricin selection results in a high frequency of single-copy transgene integration. *Plant Cell Rep* 22: 645-52
- MacVinish LJ CG, Ropenga A, Cuthbert AW. 2007. Chloride transporting capability of Calu-3 epithelia following persistent knockdown of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *150 Br J Pharmacol*: 1055-65
- Madsen HL AL, Christiansen L, Brockhoff P, Bertelsen G. 1996. Antioxidative activity of summer savory *Satureja hortensis* L and rosemary *Rosmarinus officinalis* L in minced, cooked pork meat. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 203: 333-38
- Mah TF, O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* 9: 34-9
- Mahenthiralingam E, Campbell ME, Speert DP. 1994. Nonmotility and phagocytic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronically colonized patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 62: 596-605
- Mai GT, Seow WK, Pier GB, McCormack JG, Thong YH. 1993. Suppression of lymphocyte and neutrophil functions by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate): reversal by physicochemical, alginase, and specific monoclonal antibody treatments. *Infect Immun* 61: 559-64
- Maiuri MC, De Stefano D, Di Meglio P, Irace C, Savarese M, et al. 2005. Hydroxytyrosol, a phenolic compound from virgin olive oil, prevents macrophage activation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 371: 457-65
- Mäkinen K. 2000. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? *Med Hypotheses* 54 603-13
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB. 2000. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF-kappa B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J Immunol* 164: 6509-19
- Mashburn-Warren L, Howe J, Brandenburg K, Whiteley M. 2009. Structural requirements of the *Pseudomonas* quinolone signal for membrane vesicle stimulation. *J Bacteriol.* 191(10):3411-4.
- Mattick JS, Whitchurch CB, Alm RA. 1996. The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*--a review. *Gene* 179: 147-55
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, et al. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143 (Pt 12): 3703-11
- McLean RJ, Pierson LS, 3rd, Fuqua C. 2004. A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J Microbiol Methods* 58: 351-60

- Merz AJ, So M. 2000. Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 423-57
- Miller J. 1972. Experiments in Molecular Genetics. *Cold Spring Harbor Laboratory, NY.*: 352-55
- Miller MB, Bassler BL. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55: 165-99
- Moreno S ST, Romano CS, Vojnov AA. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res.* 40: 223-31
- Moss RB, Hsu YP, Olds L. 2000. Cytokine dysregulation in activated cystic fibrosis (CF) peripheral lymphocytes. *Clinical and experimental immunology* 120: 518-25
- Mowrey DB. 1990. The scientific validation of herbal medicine. NewYork: McGraw-Hill 255
- Muller M. 2002. Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic Biol Med* 33: 1527-33
- Munne-Bosch S, Alegre L. 2001. Subcellular compartmentation of the diterpene carnosic acid and its derivatives in the leaves of rosemary. *Plant physiology* 125: 1094-102
- Murray TS, Kazmierczak BI. 2006. FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188: 6995-7004
- Musthafa KS, Sivamaruthi BS, Pandian SK, Ravi AV. 2012. Quorum sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by antagonistic compound phenylacetic acid. *Current microbiology* 65: 475-80
- Nakamura H, Yoshimura K, Jaffe HA, Crystal RG. 1991. Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem* 266: 19611-7
- Nathan C. 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420: 846-52
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 104: 313-22
- Needham L, Hellewell PG, Williams TJ, Gordon JL. 1988. Endothelial functional responses and increased vascular permeability induced by polycations. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 59: 538-48
- Newman DJ, Cragg, G.M., Snader, K.M. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *J. Nat. Prod* 66: 1022-37
- Nicas TI, Bradley J, Lochner JE, Iglewski BH. 1985 a. The role of exoenzyme S in infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 152: 716-21
- Nicas TI, Iglewski BH. 1985. The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J Microbiol* 31: 387-92
- Nickoloff JA. 1995. Methods in molecular Biology. Electroporation Protocols For Microorganisms 47
- Noone PG, Knowles MR. 2001. 'CFTR-opathies': disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations. *Respiratory research* 2: 328-32
- Nougayrede JP, Fernandes PJ, Donnenberg MS. 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cellular microbiology* 5: 359-72

- O'Leary KA, de Pascual-Tereasa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G. 2004. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutation research* 551: 245-54
- O'May C TN. 2011 The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Appl Environ Microbiol.* 77: 3061-7
- O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295-304
- O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB, Kolter R. 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* 310: 91-109
- Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J. 1994. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 176: 2044-54
- Ochsner UA, Reiser J. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 6424-8
- Oh DKK, S. Y. Kim, J. H. 1998. Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. *Biotechnology and bioengineering* 58: 440-4
- Oluwatuyi M, Kaatz GW, Gibbons S. 2004. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry* 65: 3249-54
- Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, Yasuda A, Yanagisawa R, et al. 2004. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *Biofactors* 21: 127-31
- Overhage J BM, Brazas MD, Hancock RE. 2008 Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* 190 2671-79
- Pace NR. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-40
- Parke DV, Sapota A. Chemical toxicity and reactive oxygen species. *Int J Occup Med Environ Health.* 1996;9:331-4
- Parsek MR, Val DL, Hanzelka BL, Cronan JE, Jr., Greenberg EP. 1999. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4360-5
- Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH. 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260: 1127-30
- Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 179: 5756-67
- Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 181: 1203-10
- Pedersen SS, Jensen T, Hoiby N, Koch C, Flensburg EW. 1987. Management of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in Danish cystic fibrosis patients. *Acta paediatrica Scandinavica* 76: 955-61

- Peldyak J. 1996. Xylitol Sweeten your smile. Sweet Smart. *Mt Pleasant, MI: Advanced Developments Inc.* : 3-51
- Peldyak J, Makinen KK. 2002. Xylitol for caries prevention. *Journal of dental hygiene : JDH / American Dental Hygienists' Association* 76: 276-85
- Peng CH, Su JD, Chyau CC, Sung TY, Ho SS, et al. 2007. Supercritical fluid extracts of rosemary leaves exhibit potent anti-inflammation and anti-tumor effects. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71: 2223-32
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 179: 3127-32
- Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, et al. 2001. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 183: 6676-83
- Pier GB. 2000. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8822-8
- Poeckel D, Greiner C, Verhoff M, Rau O, Tausch L, et al. 2008. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochemical pharmacology* 76: 91-7
- Potter JL, Matthews LW, Spector S, Lemm J. 1967. Studies on pulmonary secretions. II. Osmolality and the ionic environment of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy. *The American review of respiratory disease* 96: 83-7
- Powers CA, Potter EM, Wessel HU, Lloyd-Still JD. 1996. Cystic fibrosis in Asian Indians. *Archives of pediatrics & adolescent medicine* 150: 554-5
- Pratt LA, Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* 30: 285-93
- Priya K, Yin WF, Chan KG. Anti-quorum sensing activity of the traditional Chinese herb, *Phyllanthus amarus*. 2013. *Sensors*.13(11):14558-69.
- Proud D, Leigh R. 2011. Epithelial cells and airway diseases. *Immunological reviews* 242: 186-204
- Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM. 2005. Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 67: 8-18
- Quinton PM. 1983. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301: 421-2
- Rabin SDP HA. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, a toxin transported by the type III secretion system, kills *Saccharomyces cerevisiae* *Infection and Immunity* 71: 4144-50
- Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochemical pharmacology* 72: 1439-52
- Rahme LG, Stevens EJ, Wolfort SF, Shao J, Tompkins RG, Ausubel FM. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268: 1899-902

- Rahme LG, Tan MW, Le L, Wong SM, Tompkins RG, et al. 1997. Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13245-50
- Rampart M, Beetens JR, Bult H, Herman AG, Parnham MJ, Winkelmann J. 1986. Complement-dependent stimulation of prostacyclin biosynthesis: inhibition by rosmarinic acid. *Biochemical pharmacology* 35: 1397-400
- Ramphal R, Sadoff JC, Pyle M, Silipigni JD. 1984. Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to injured tracheal epithelium. *Infect Immun* 44: 38-40
- Ramsey BW, Astley SJ, Aitken ML, Burke W, Colin AA, et al. 1993. Efficacy and safety of short-term administration of aerosolized recombinant human deoxyribonuclease in patients with cystic fibrosis. *The American review of respiratory disease* 148: 145-51
- Rasmussen TB, Manefield M, Andersen JB, Eberl L, Anthoni U, et al. 2000. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. *Microbiology* 146 Pt 12: 3237-44
- Reading NC, Sperandio V. 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS microbiology letters* 254: 1-11
- Reimann C, Ginet N, Michel L, Keel C, Michaux P, et al. 2002. Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 148: 923-32
- Ringbom T, Segura L, Noreen Y, Perera P, Bohlin L. 1998. Ursolic acid from *Plantago major*, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 catalyzed prostaglandin biosynthesis. *Journal of natural products* 61: 1212-5
- Rivera LEPR, A. and Padilla Desgarenes, M.C. 2010. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Rev Mex* 2010; 54: 14-24
- Riordan JR1, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, et al. 1989 Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245 1066-73
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, et al. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-65
- Romo Vaquero M, Yanez-Gascon MJ, Garcia Villalba R, Larrosa M, Fromentin E, et al. 2012. Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in Zucker rats fed a rosemary extract rich in carnosic acid. *PLoS one* 7: e39773
- Rosanna DP1, Salvatore C. 2012 Reactive oxygen species, inflammation, and lung diseases. *Curr Pharm* 18(26):3889-900.
- Rosenstein BJ, Eigen H. 1991. Risks of alternate-day prednisone in patients with cystic fibrosis. *Pediatrics*. 87(2):245-6.
- Rumbaugh KP, Griswold JA, Iglewski BH, Hamood AN. 1999. Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in burn wound infections. *Infect Immun* 67: 5854-62
- Rust L, Messing CR, Iglewski BH. 1994. Elastase assays. *Methods Enzymol* 235: 554-62

- Ryu SY, Oak MH, Yoon SK, Cho DI, Yoo GS, et al. 2000. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Med* 66: 358-60
- Safayhi H, Sailer ER. 1997. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. *Planta Med* 63: 487-93
- Sajjan U, Moreira J, Liu M, Humar A, Chaparro C, Forstner J, Keshavjee S. 2004 A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol. *J Heart Lung Transplant*. 23(12):1382-91.
- Sakurai H, Kohsaka H, Liu MF, Higashiyama H, Hirata Y, et al. 1995. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J Clin Invest* 96: 2357-63
- Sanbongi CT, H. Osakabe, N.Sasa, N. Natsume, M. Yanagisawa, R. Inoue, K. I. Sadakane, K. Ichinose, T. Yoshikawa, T. 2004. Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clin Exp Allergy* 34: 971-7
- Sandasi M, Leonard CM, Viljoen AM. 2010. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology* 50: 30-5
- Sato H, Okinaga K, Saito H. 1988. Role of pili in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* burn infection. *Microbiology and immunology* 32: 131-9
- Sauer K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome biology* 4: 219
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184: 1140-54
- Schwarz K, Ternes W. 1992. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Z Lebensm Unters Forsch* 195: 99-103
- Segal E. 2004. Fibrosis Quística. *Ediciones Journal* 1
- Semmler AB, Whitchurch CB, Mattick JS. 1999. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145 (Pt 10): 2863-73
- Shak S. 1995. Aerosolized recombinant human DNase I for the treatment of cystic fibrosis. *Chest* 107: 65S-70S
- Shan Z, Xu H, Shi X, Yu Y, Yao H, et al. 2004. Identification of two new genes involved in twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 150: 2653-61
- Shaver CM, Hauser AR. 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun* 72: 6969-77
- Shaw PD, Ping G, Daly SL, Cha C, Cronan JE, Jr., et al. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6036-41
- Shen BQ, Finkbeiner WE, Wine JJ, Mrsny RJ, Widdicombe JH. 1994. Calu-3: a human airway epithelial cell line that shows cAMP-dependent Cl⁻ secretion. *Am J Physiol* 266: L493-501

- Sheng D, Liu R, Xu Z, Singh P, Shen B, Hua Y. 2005. Dual negative regulatory mechanisms of RecX on RecA functions in radiation resistance, DNA recombination and consequent genome instability in *Deinococcus radiodurans*. *DNA repair* 4: 671-8
- Sherman TS, Chen Z, Yuhanna IS, Lau KS, Margraf LR, Shaul PW. 1999. Nitric oxide synthase isoform expression in the developing lung epithelium. *Am J Physiol* 276: L383-90
- Shetty K. 1997. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; Focus on Lamiaceae. *Asia Pac J Clin Nutr* 6 162-71 Shetty K VD, Clydesdale FM. . 2005. Clonal screening and sprout based bioprocessing of phenolic phytochemicals for functional foods. In: Shetty K, Pometto T, Paliyath A, Levin RE, editors. Food biotechnology. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc.603
- Silva AF. 2010 a. Avaliação in-vitro da atividade antimicrobiana e da propriedade antiaderente do xilitol. *MSc Dissertation, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora - MG, Brazil*
- Silva, A.F., Silva, S.S., Oliveira, M.G. and Raposo, N.R.B. 2010b, Inibição in vitro da aderência de enteropatógenos pelo xilitol. *Rev. Ciênc. Médicas e Biológicas*, 9, 42-49. [
- Silva, A.F., Suzuki, E.Y., Ferreira, A.S., Oliveira, M.G., Silva, S.S. and Raposo, N.R.B. (2011), In vitro inhibition of adhesion of *Escherichia coli* strains by xylitol. *Braz Arch Biol Technol*, 54, 235-241.
- Silva, D.D.V., Mancilha I.M., Silva, S.S. and Felipe, M.G.A. (2007), Improvement of biotechnological xylitol production by glucose during cultivate of *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. *Braz Arch Biol Technol*, 50, 207-215
- Smith AL, Redding G, Doershuk C, Goldmann D, Gore E, et al. 1988. Sputum changes associated with therapy for endobronchial exacerbation in cystic fibrosis. *The Journal of pediatrics* 112: 547-54
- Smith RS, Fedyk ER, Springer TA, Mukaida N, Iglewski BH, Phipps RP. 2001. IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2. *J Immunol* 167: 366-74
- Smith RS, Harris SG, Phipps R, Iglewski B. 2002. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation in vivo. *J Bacteriol* 184: 1132-9
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. 1996. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271: 33157-60
- Söderling, E. and Hietala-Lenkkeri, A. (2010), Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. *Curr. Microbiol.*, 60, 25-29
- Sokurenko EV, Tchesnokova V, Yeung AT, Oleykowski CA, Trintchina E, et al. 2001. Detection of simple mutations and polymorphisms in large genomic regions. *Nucleic acids research* 29: E111
- Solange Inês Mussatto ICR. 2002. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 38: 401-13
- Sparkman L, Boggaram V. 2004. Nitric oxide increases IL-8 gene transcription and mRNA stability to enhance IL-8 gene expression in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L764-73

- Spencer DH, Kas A, Smith EE, Raymond CK, Sims EH, et al. 2003. Whole-genome sequence variation among multiple isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185: 1316-25
- Standiford TJ, Kunkel SL, Basha MA, Chensue SW, Lynch JP, 3rd, et al. 1990. Interleukin-8 gene expression by a pulmonary epithelial cell line. A model for cytokine networks in the lung. *J Clin Invest* 86: 1945-53
- Stehling, E.G. (1999), Estudo comparativo dos fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de fibrose cística e outras infecções. MSc Dissertation, State University of Campinas, Campinas - SP, Brazil.
- Stewart Ceri E. TEE, Mohd Jamili Nur H. , Bosquillon Cynthia, and Sayers Ian. 2012. Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research. *Journal of Allergy*
- Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW. 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67: 5608-13
- Storey DG, Ujack EE, Rabin HR. 1992. Population transcript accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A and elastase in sputa from patients with cystic fibrosis. *Infect Immun* 60: 4687-94
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, et al. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-64
- Subbaramaiah K, Cole PA, Dannenberg AJ. 2002. Retinoids and carnosol suppress cyclooxygenase-2 transcription by CREB-binding protein/p300-dependent and - independent mechanisms. *Cancer research* 62: 2522-30
- Suleyman H, Yildirim D, Aslan A, Gocer F, Gepdiremen A, Guvenalp Z. 2002. An investigation of the antiinflammatory effects of an extract from *Cladonia rangiformis* HOFFM. *Biol Pharm Bull* 25: 10-3
- Sun Y, Wu F, Sun F, Huang P. 2008. Adenosine promotes IL-6 release in airway epithelia. *J Immunol* 180: 4173-81
- Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, et al. 2001. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappa B activation. *Mutation research* 480-481: 243-68
- Takahashi C, Nozawa T, Tanikawa T, Nakagawa Y, Wakita J, et al. 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 without differentiation into elongated hyperflagellates on hard agar minimal medium. *FEMS microbiology letters* 280: 169-75
- Takano H, Osakabe N, Sanbongi C, Yanagisawa R, Inoue K, et al. 2004. Extract of *Perilla frutescens* enriched for rosmarinic acid, a polyphenolic phytochemical, inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. *Exp Biol Med (Maywood)* 229: 247-54
- Takase H, Nitani H, Hoshino K, Otani T. 2000. Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun* 68: 1834-9

- Takumida M, Anniko M. 2006. Protective effect of edaravone against the ototoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Acta oto-laryngologica* 126: 15-9
- Tamura H, Yamashita S, Kusano N, Suzuki C, Yamaguchi Y, et al. 1998. Fulminant hepatitis complicated by small intestine infection and massive hemorrhage. *Journal of gastroenterology* 33: 412-8
- Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2408-13
- Tang HB, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, et al. 1996. Contribution of specific *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors to pathogenesis of pneumonia in a neonatal mouse model of infection. *Infect Immun* 64: 37-43
- Tapiainen, M.T., Kontiokari, T., Sammalkivi, L., Ikaheimo, I., Koskela, M. and Uhari, M. (2001), Effect of xylitol on growth of *Streptococcus pneumoniae* in the presence of fructose and sorbitol. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 166-169.
- Tapiainen T. 2002. Microbiological effects and clinical use of xylitol in preventing acute otitis media. *diss, Oulu University of Oulu*
- Tapiainen T, Sormunen R, Kajjalainen T, Kontiokari T, Ikaheimo I, Uhari M. 2004. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. *J Antimicrob Chemother* 54: 225-8
- Teixeira MM, Williams TJ, Hellewell PG. 1993. Role of prostaglandins and nitric oxide in acute inflammatory reactions in guinea-pig skin. *British journal of pharmacology* 110: 1515-21
- Telford G, Wheeler D, Williams P, Tomkins PT, Appleby P, et al. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun* 66: 36-42
- Tomasz A. 1965. Control of the competent state in *Pneumococcus* by a hormone-like cell product: an example for a new type of regulatory mechanism in bacteria. *Nature* 208: 155-9
- Toso C, Williams DM, Noone PG. 1996. Inhaled antibiotics in cystic fibrosis: a review. *The Annals of pharmacotherapy* 30: 840-50
- Tremblay J, Deziel E. 2008. Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *J Basic Microbiol* 48: 509-15
- Uhari M KT, Niemelä M. 1998. A novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. *Pediatrics* 102 879-84
- Uhari MK, T. Koskela, M.Niemela, M. 1996. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomised trial. *BMJ* 313: 1180-4
- Usher LR, Lawson RA, Geary I, Taylor CJ, Bingle CD, et al. 2002. Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J Immunol* 168: 1861-8
- Vallet I, Olson JW, Lory S, Lazdunski A, Filloux A. 2001. The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6911-6

- VanDelden C. 2004. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. In volumen: *Pseudomonas* Volume 2 edited by Ramos J.L, Kluwer Academic/Plenum Publishers New York. 3-45
- Vattem DA GR, Shetty K. 2005. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. *Asia Pac J Clin Nutr* 14(2): 120-30
- Vattem DA, Lin, Y-T., Ghaedian, R. and Shetty, K. . 2005b. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. *Process Biochemistry* 40 1583-92
- Vattem DAaS, K. 2005. Functional phytochemicals from cranberries: their mechanism of action and strategies to improve functionality. In: *Food Biotechnology, 2nd Edition [Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A.L. III and Levin, R.E. (eds)]. [Food biotechnology. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc; 2005. p. 789]: 789*
- Ventre I, Ledgham F, Prima V, Lazdunski A, Foglino M, Sturgis JN. 2003. Dimerization of the quorum sensing regulator RhIR: development of a method using EGFP fluorescence anisotropy. *Mol Microbiol* 48: 187-98
- Verstraeten N, Braeken K, Debkumari B, Fauvart M, Fransaeer J, et al. 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in microbiology* 16: 496-506
- Vitkauskiene A, Scheuss S, Sakalauskas R, Dudzevicius V, Sahly H. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* strains from nosocomial pneumonia are more serum resistant than *P. aeruginosa* strains from noninfectious respiratory colonization processes. *Infection* 33: 356-61
- Wallace RJ. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proc Nutr Soc* 63: 621-9
- Watnik RL. 2000. Antikickback versus stark: what's the difference? *Healthcare financial management : journal of the Healthcare Financial Management Association* 54: 66-7
- Welsh MJ, Smith AE. 1993. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 73: 1251-4
- Welsh MJ, Smith AE. 1995. Cystic fibrosis. *Scientific American* 273: 52-9
- Welsh MJ, Zabner J, Graham SM, Smith AE, Moscicki R, Wadsworth S. 1995. Adenovirus-mediated gene transfer for cystic fibrosis: Part A. Safety of dose and repeat administration in the nasal epithelium. Part B. Clinical efficacy in the maxillary sinus. *Human gene therapy* 6: 205-18
- Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews* 25: 365-404
- WHO. 2012. World Health Organization.
- WHO GWPWWHO. 2001. Legal Status of Traditional Medicine and Complementary Alternative Medicine, a Worldwide Review.
- Wick MJ, Hamood AN, Iglewski BH. 1990. Analysis of the structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Mol Microbiol* 4: 527-35
- Williams TJ, Hellewell PG, Jose PJ. 1986. Inflammatory mechanisms in the Arthus reaction. *Agents and actions* 19: 66-72

- Williams TJ, Peck MJ. 1977. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature* 270: 530-2
- Winans SC. 2002. Bacterial esperanto. *Nature structural biology* 9: 83-4
- Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull.* 1993; 49:506–22.
- Wiseman S, Mulder T, Rietveld A. 2001. Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. *Antioxidants & redox signaling* 3: 1009-21
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-71
- Woods DE, Iglewski BH. 1983. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*: new perspectives. *Rev Infect Dis* 5 Suppl 4: S715-22
- Xian YF, Mao QQ, Ip SP, Lin ZX, Che CT. Comparison on the Anti-inflammatory Effect of Cortex Phellodendri Chinensis and Cortex Phellodendri Amurensis in 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate-induced ear edema in mice. 2011. *Journal of Ethnopharmacology.* 137(3):1425-30.
- Xu WM, Liu LZ. 1998. Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. Recent progress in nitric oxide research. *Cell research* 8: 251-8
- Yi W, Wetzstein HY. 2010. Biochemical, biological and histological evaluation of some culinary and medicinal herbs grown under greenhouse and field conditions. *Journal of the science of food and agriculture* 90: 1063-70
- Yoon SB, Lee YJ, Park SK, Kim HC, Bae H, et al. 2009. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol* 125: 286-90
- Yu YM, Lin CH, Chan HC, Tsai HD. 2009. Carnosic acid reduces cytokine-induced adhesion molecules expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *European journal of nutrition* 48: 101-6
- Zabner JS, M. P. Launspach, J. L. Karp, P. H. Kearney, W. R. Look, D. C. Smith, J. J. Welsh, M. J. 2000. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11614-9
- Zampini IC, Vattuone MA, Isla MI. 2005. Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *J Ethnopharmacol* 102: 450-6
- Zhang LH, Dong YH. 2004. Quorum sensing and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* 53: 1563-71
- Zhang X, Bremer H. 1995. Control of the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter strength by ppGpp. *J Biol Chem* 270: 11181-9
- Zhang Y, Barbieri JT. 2005. A leucine-rich motif targets *Pseudomonas aeruginosa* ExoS within mammalian cells. *Infect Immun* 73: 7938-45
- Zhu Y, Chidekel A, Shaffer TH. 2010. Cultured human airway epithelial cells (calu-3): a model of human respiratory function, structure, and inflammatory responses. *Critical care research and practice* 2010

Zielenski J. 2000. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration; international review of thoracic diseases* 67: 117-33