

Universidad Peruana Cayetano Heredia
Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA

**Presencia de Inmunoglobulina A secretora contra proteínas del
Sistema de Secreción Tipo III de *Pseudomonas aeruginosa* en
calostro humano**

Luis Esteban Cabrera Sosa

**Tesis para optar el título profesional de
Licenciado en Biología**

Lima, Perú
2017

Asesora: Dra. Theresa Ochoa Woodell

Co-Asesor: MSc(c) David Durand Vara

Jurado Calificador

Presidenta: Dra. Manuela Verástegui Pimentel

Secretaria: Dra. Vanessa Adui Sicheri

Vocal: Dra. Cristina Guerra Giraldez

A mis padres: mamá Carmen y papá Tito

Agradecimientos

Este trabajo no ha podido ser posible sin la ayuda de varias personas.

En primer lugar, quiero mencionar a la Dra. Theresa Ochoa, quien no solo me aceptó a formar parte de su equipo de trabajo, sino que también ha sido una gran maestra, tanto en lo académico como en lo profesional. Estaré siempre agradecido por todo.

En segundo lugar, quiero agradecer a MSc(c) David Durand, quien me ha asesorado, guiado, enseñado y más en la tesis. Gracias por tenerme paciencia, en los buenos y malos momentos del trabajo, y por convencerme en trabajar con Western blot porque “la técnica es fácil”.

También quiero agradecer al Dr. Alan Hauser, Northwestern University, por su amabilidad y su colaboración al donar los anticuerpos policlonales contra las proteínas estudiadas; y al Dr. Joaquín Ruiz, Universidad de Barcelona, por proporcionar la cepa usada en este trabajo. Además, quiero mencionar a los laboratorios de Neurocisticercosis, Microbiología Molecular, Pathoantígenos y Malaria, de la UPCH, por su ayuda técnica o en reactivos.

Asimismo, gracias a todos mis amigos de Laboratorio de Infectología Pediátrica y de Enfermedades Entéricas y Nutrición: Erik, Maribel, Karen, Lizeth, Noemí, Indira, Rodrigo, Ana, Steve, Deborah, Sara, Arturo, Madheli y Katty; quienes entre bromas y consejos, han estado muy atentos a cada avance de la tesis, siempre dispuestos a ayudarme.

No quiero olvidar de mencionar a mi familia; en especial a mis padres, por apoyarnos y acompañarnos en todo lo que nos proponemos. Con ellos también estaré eternamente agradecido.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos de la universidad: Viviana, Alejandra P., Andrea, Iván, Sebastian, Alejandra S., Jovanka, José Alberto, María Claudia, Carolina y Josué, por distraerme en los momentos precisos y por todo lo que hemos pasamos.

Una vez más, muchas gracias a todos.

Luis Cabrera

Índice

Resumen.....	1
Abstract.....	2
I. Introducción.....	3
I.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
I.1.1 Infecciones.....	4
I.1.2 Factores de virulencia.....	5
I.2 Sistema Inmune.....	10
I.2.1 Sistema inmune innato.....	11
I.2.2 Sistema inmune adaptativo.....	13
I.2.3 Leche materna y calostro.....	18
I.3 Planteamiento del problema.....	24
II. Hipótesis y Objetivos.....	25
II.1 Hipótesis.....	25
II.2 Objetivos.....	25
II.2.1 Objetivo general.....	25
II.2.2 Objetivos específicos.....	25
III. Materiales y Métodos.....	26
III.1 Muestras de calostro.....	26
III.2 Crecimiento bacteriano.....	27
III.3 Extracción de proteínas.....	27
III.4 Estandarización de la inducción del T3SS.....	28
III.5 Estandarización del Western blot.....	29
III.5.2 Concentración de anticuerpos.....	30
III.5.2 Protocolo de Western blot.....	31
III.5.3 Técnica de detección colorimétrica.....	31
III.6 Análisis de muestras.....	32
III.7 Análisis estadístico.....	32
IV. Resultados.....	33

IV.1	Característica de la población.....	33
IV.2	Crecimiento de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.	34
IV.3	Efecto del volumen del sobrenadante en la extracción de proteínas.	35
IV.4	Efecto del EGTA y Mg ²⁺ en la inducción del sistema de secreción tipo III ..	36
IV.5	Estandarización del Western blot	38
IV.6	Análisis de muestras	43
V.	Discusión	48
VI.	Conclusiones	56
VII.	Recomendaciones	57
VIII.	Referencias bibliográficas.....	58

Lista de Figuras

Figura 1. El sistema de secreción tipo III (T3SS).....	7
Figura 2. Curva de crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	35
Figura 3. Estandarización de la extracción de proteínas.....	36
Figura 4. Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 a distintas condiciones de EGTA y Mg ²⁺	37
Figura 5. Estandarización de la inducción del T3SS de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	38
Figura 6. Estandarización de la concentración de anticuerpos.....	40
Figura 7. Estandarización del protocolo de Western blot.....	41
Figura 8. Elección del método de revelado.....	42
Figura 9. Análisis de muestras.....	43

Lista de Tablas

Tabla 1. Proteínas del T3SS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
Tabla 2. Trabajos sobre la detección de inmunoglobulinas A secretoras (sIgA) en muestras de leche y sus antígenos.....	20
Tabla 3. Protocolos utilizados para la estandarización del Western Blot.....	29
Tabla 4. Características de las poblaciones en estudio.....	33
Tabla 5. Frecuencia de sIgA contra el T3SS de <i>P. aeruginosa</i> en muestras de calostro....	44
Tabla 6. Perfil de anticuerpos contra el T3SS de <i>P. aeruginosa</i> en las muestras de calostro.....	45
Tabla 7. Intensidad de bandas que corresponden a los anticuerpos contra el T3SS de <i>P. aeruginosa</i>	46
Tabla 8. <i>Odds ratio</i> e intervalos de confianza al 95% de la presencia de los sIgA contra el T3SS de <i>P. aeruginosa</i> según las características maternas.....	47

Resumen

Introducción: *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria oportunista que usa el sistema de secreción tipo III (T3SS) para infectar a su hospedero. Por otro lado, la leche materna otorga protección al recién nacido mediante las inmunoglobulinas A secretoras (sIgA). Se ha encontrado sIgA contra el T3SS de enteropatógenos en calostro e inmunoglobulina G contra el T3SS de *P. aeruginosa* en suero de pacientes con fibrosis quística.

Objetivo: El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de sIgA contra las proteínas del T3SS de *P. aeruginosa* en calostro de mujeres peruanas.

Métodos: Se estandarizaron las condiciones para inducir el T3SS de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 y un Western blot para detectar sIgA contra ExoT, ExoS, PopB y PopD en calostro. Se evaluó la presencia de los anticuerpos en 150 muestras de calostro previamente recolectadas, provenientes de madres con hijos a término (AT, n=75) o con hijos pretérmino (PT, n=75). Se realizó una semicuantificación a partir de la intensidad de la banda y un análisis estadístico exploratorio para evaluar la asociación entre la presencia de las sIgA y características maternas.

Resultados: El crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 en caldo Luria Bertani con EGTA 2.5mM y MgCl₂ 10mM indujo el T3SS. En el Western Blot, se usaron diluciones bajas (1/20 – 1/200) de los anticuerpos policlonales contra el T3SS de *P. aeruginosa*, las muestras de calostro y los anticuerpos secundarios. La prevalencia de sIgA contra ExoT fue 69% (103/150), contra ExoS y PopB fue 80% (120/150) para cada uno y contra PopD fue 65% (97/150). El perfil de anticuerpos más común fue la presencia de las cuatro sIgA (43%). Las intensidades de las bandas para las sIgA contra ExoT y ExoS fueron mayores en las madres con hijos PT con respecto a aquellas con hijos AT ($p < 0.001$). La presencia simultánea de los 4 anticuerpos no pudo ser explicada por características maternas.

Conclusiones: Se encontró una prevalencia alta de sIgA (> 60%) contra el T3SS de *P. aeruginosa* en el calostro de mujeres peruanas, lo que indica una exposición previa al patógeno. Estos anticuerpos podrían tener un efecto protector ante infecciones por esta bacteria, por lo que se recomienda cuantificarlos y determinar su actividad funcional.

Palabras claves: *Pseudomonas aeruginosa*, Sistema de secreción tipo III, Calostro, Inmunoglobulina A secretora.

Abstract

Background: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunist pathogen and uses the type III secretion system (T3SS) to infect its host. On the other hand, breast milk provides protection to the newborn through secretory immunoglobulins A (sIgA). Additionally, there were sIgA against T3SS of enteropathogens in colostrum, and immunoglobulins G against T3SS of *P. aeruginosa* in serum of cystic fibrosis patients.

Objective: The aim of this study was to determine the presence of sIgA against T3SS proteins of *P. aeruginosa* in colostrum of Peruvian women.

Methods: Conditions for inducing the T3SS of *P. aeruginosa* PAO1 strain, and a Western Blot for the detection of sIgA against ExoT, ExoS, PopB and PopD in colostrum were standardized. The presence of such antibodies were evaluated in 150 previously collected colostrum samples from mothers with a term (TE, n=75) or preterm (PT, n=75) children. A semi-quantification of sIgA based on band intensity, and an exploratory analysis in order to evaluate the association between the presence of these sIgA and maternal factor were performed.

Results: The growth of *P. aeruginosa* PAO1 strain in Luria Bertani broth supplemented with 2.5 mM EGTA and 10mM MgCl₂ induced the T3SS. In the Western blot, polyclonal antibodies against T3SS of *P. aeruginosa*, colostrum samples, and secondary antibodies were used at low dilution factors (1/20 – 1/200). The prevalence of sIgA against ExoT was 69% (103/150), against ExoS and PopB was 80% (120/150) for each one, and against PopD was 65% (97/150). The most common antibody profile was the presence of all studied sIgA (43%). Band intensities corresponding to sIgA against ExoT and ExoS were higher in mothers with PT children than those with TE children ($p < 0.001$). The simultaneous presence of the four antibodies could not be explained by any maternal factor.

Conclusions: There was a high prevalence (> 60%) of sIgA against T3SS proteins of *P. aeruginosa* in Peruvian women's colostrum, indicating previous exposure to the pathogen. These antibodies may have a protective effect against infections by this bacterium, so it is recommended to quantify them and to determine their functional activity.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Type III Secretion System, Colostrum, Secretory Immunoglobulin A.

I. Introducción

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno que se puede encontrar en ambientes distintos, como agua, aire y suelos. Debido a esto, es capaz de infectar a diversos tipos de hospederos, incluyendo plantas y animales. En humanos, es conocido por ocasionar infecciones oportunistas, especialmente en personas inmunosuprimidas, como los recién nacidos (De Bentzmann y Plésiat, 2011).

Los factores de virulencia de *P. aeruginosa* le permiten tener diversas manifestaciones clínicas, aunque usualmente está asociado a infecciones respiratorias (Gellaly y Hancock, 2013). Entre sus factores de virulencia, el sistema de secreción tipo III (T3SS) ha cobrado importancia en los últimos años, debido a que se asocia con una alta tasa de mortalidad. El T3SS forma un complejo proteico, conocido como inyector, mediante el cual transporta proteínas al hospedero con la finalidad de facilitar la infección e invasión (Hauser, 2009).

La respuesta inmune contra *P. aeruginosa* incluye la participación de células del sistema innato y la producción de anticuerpos, entre los que se encuentran aquellos contra las proteínas del T3SS (Lavoie et al., 2011; Mauch y Levy, 2014). No obstante, el sistema inmune no está completamente desarrollado en los recién nacidos. En estos, el calostro (la leche materna de la primera semana) es el principal medio de protección. El calostro contiene diferentes factores protectores, principalmente las inmunoglobulinas A secretoras (sIgA) (Brandtzaeg, 2010).

Se ha descrito el papel protector de las sIgA bajo distintos mecanismos y se ha reportado la presencia en leche materna de este tipo de anticuerpos contra diferentes antígenos de diversos patógenos. Sin embargo, no hay estudios que demuestren la presencia de sIgA contra las proteínas del T3SS de *P. aeruginosa* en calostro.

I.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria anaerobia facultativa que pertenece a la clase Gammaproteobacteria y a la familia Pseudomonadaceae (Madigan et al., 2009; Dettman et al., 2013). Este organismo pertenece al grupo de bacilos gram-negativo no fermentadores de glucosa (BNNF), aunque puede fermentar arginina, citrato y otras fuentes de carbono para generar energía. Además, tiene las enzimas catalasa y oxidasa. (Madigan et al., 2009; Frimmersdorf et al., 2010). Es la única especie dentro del género *Pseudomonas* que puede crecer a 42°C. Esta bacteria puede secretar pigmentos como la piocianina, la cual es responsable del color verduzco de los cultivos (Pichardo Reyes et al., 1981). Puede ser aislada de diferentes sitios, como suelos, agua y aire; y puede infectar plantas y animales (De Bentzmann y Plésiat, 2011).

I.1.1 Infecciones

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que puede causar distintas enfermedades en humanos (Bodey et al., 1983). Entre estas, se encuentran la sepsis neonatal (Jefferies et al., 2012), la bacteremia (Micek et al., 2005), las infecciones respiratorias en pacientes con fibrosis quística (CF; Høiby et al., 2010), las infecciones intrahospitalarias, como la neumonía asociada a ventilador (Nathwani et al., 2014), las infecciones en quemaduras (Turner et al., 2014) y las infecciones oculares asociados al uso de lentes de contacto (Willcox, 2007), entre otras.

La incidencia y mortalidad asociadas a *P. aeruginosa* varían entre estas enfermedades, pero hay una tendencia a ser altas. Esta bacteria causa la mayor mortalidad (74.4%) entre las que ocasionan sepsis neonatal, a pesar de encontrarse en poca frecuencia en países desarrollados (Stoll et al., 2002). Además, la tasa de letalidad en bacteremia causada por *P. aeruginosa* varía entre 30 y 72% en el mundo (Berthelot et al., 2003). Asimismo, la prevalencia de infecciones por esta bacteria es aproximadamente 30% en infantes de 1 año con CF en Estados Unidos (Psoter et al., 2013). Por último, tiene la mayor incidencia (24.4%) y una mortalidad alta (65%) en los casos de neumonías asociadas a ventilador en el mundo (Chastre y Fagon, 2002).

El tratamiento de estas infecciones es complicado. *Pseudomonas aeruginosa* presenta resistencia intrínseca a varios antibióticos debido a la permeabilidad de su membrana externa, la presencia de bombas de flujo y de β -lactamasas (Hancock y Speert, 2000). A pesar de esto, se han usado aminoglicósidos (gentamicina y tobramicina), penicilinas semisintéticas (carbenicilina, ticarcilina, piperacilina), cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima y cefoperazona), quinolonas (ciprofloxacino) y carbapenems (meropenem e imipenen). Aunque la combinación de un β -lactámico y un aminoglicósido es la práctica común (Hancock y Speert, 2000). No obstante, la resistencia a estos antibióticos ha ido aumentando en el tiempo. De esta manera, la proporción de cepas multiresistentes de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes en cuidados intensivos ha incrementado de 4% en 1993 a 14% en 2002 (Lister et al., 2009).

I.1.2 Factores de virulencia

Esta bacteria tiene diferentes factores de virulencia que le permiten infectar a los distintos tejidos (Gellalaty y Hancock, 2013). En primer lugar, el flagelo y el pili tipo IV le confieren movilidad, pueden comenzar una respuesta inflamatoria e iniciar cascadas de señalización en epitelio respiratorio (Bucior et al., 2012). Además, el lipopolisacárido (LPS) puede generar la producción de citoquinas proinflamatorias y shock endotóxico; usualmente mediado por el lípido A y el antígeno O, componentes del LPS (Pier, 2007).

Asimismo, las enzimas con actividad proteasa son importantes en infecciones oculares y sepsis. Entre estas se encuentran la proteasa alcalina, que puede romper flagelina del hospedero; las elastasas, que pueden hidrolizar la membrana celular o el surfactante de opsonización; y la proteasa IV, que es capaz de degradar el sistema de complemento, inmunoglobulinas y el fibrinógeno (Kida et al., 2008).

Por otro lado, destacan otros factores de virulencia, como la exotoxina A (ExoA), que altera la traducción del hospedero; la piocianina, que genera estrés oxidativo; la pioverdina, que es un sideróforo y funciona como molécula señal para expresión; los sistemas de secreción, entre otros (Gellalaty y Hancock, 2013).

Los sistemas de secreción son complejos de proteínas que permiten a las bacterias Gram negativa exportar toxinas, ya sea al medio extracelular o directamente al hospedero (Costa et al., 2015). Se han descrito 6 tipos de sistema de secreción, los cuales se clasifican dependiendo si usan uno (tipos I, III, IV y VI) o dos (tipos II y V) pasos para llevar las proteínas al hospedero. Además, se ha descrito que los micobacteria y algunas Gram positivas pueden producir un sétimo tipo de sistema de secreción, aunque aún no se ha visto presente en las Gram negativas (Houben et al., 2014).

El sistema de secreción tipo I es dependiente de chaperonas y está asociado a la familia de transportadores ABC; mientras que el tipo II es dependiente del sistema de transporte Sec para llevar las proteínas al periplasma y luego estas traspasan la membrana exterior por un poro formado de polímeros de secretina (Costa et al., 2015). Como se describirá más adelante, el sistema de secreción tipo III usa un complejo aguja para inyectar proteínas al citosol del hospedero. En tanto, el tipo IV es homólogo a la maquinaria de conjugación, por lo que puede transportar proteínas y ADN hacia el hospedero directamente; mientras que el tipo V, también denominado como el sistema de autotransportadores, depende del sistema de transporte Sec. Las proteínas que transporta el sistema tipo V son codificadas y traducidas con su poro secretor, cuya secuencia es cortada posteriormente. Finalmente, el tipo VI fue el último en ser descrito en Gram negativas, está distribuido principalmente en Proteobacteria y presenta algunas proteínas homólogas a las presentes en el fago T4 (Costa et al., 2015).

Pseudomonas aeruginosa posee todos los sistemas de secreción, excepto el tipo IV. Sin embargo, el sistema de secreción tipo III (T3SS) es el más destacable, no solo en *P. aeruginosa*, sino también en algunos patotipos de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella* sp., etc. (Filloux et al., 2011; Chatterjee et al., 2013).

El T3SS está conformado por dos anillos, un complejo aguja o inyectosoma, un poro o translocador y las proteínas efectoras (Fig. 1). Las proteínas que forman los anillos son llevadas y ancladas en las membranas interna y externa de la bacteria. Mientras tanto, las proteínas del inyectosoma comienzan a ser secretadas y polimerizadas para conectar al

patógeno con la célula hospedera. Posteriormente, se secretan las proteínas que formarán el poro en la membrana del hospedero. Finalmente, por el proceso de translocación, las proteínas efectoras pasan por el “camino” formado y al llegar a la célula hospedera, generan cambios internos que facilitan la infección (Coburn et al., 2007).

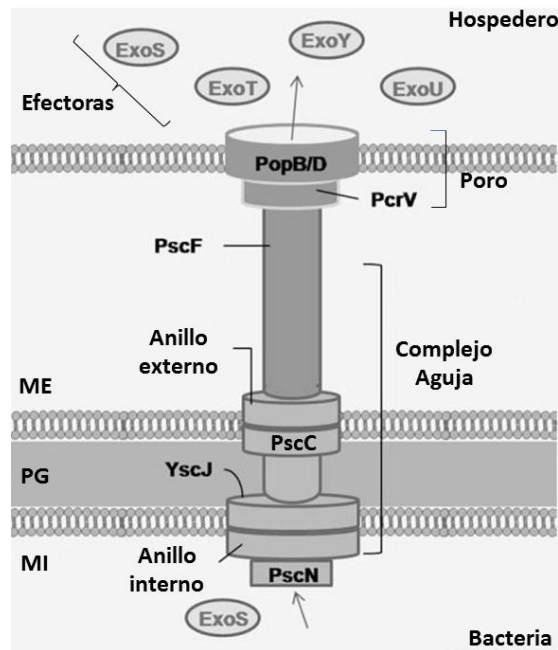


Figura 1. El sistema de secreción tipo III (T3SS) de *Pseudomonas aeruginosa*. El T3SS está compuesto de dos anillos (PscN, YscJ y PscC), el complejo aguja (PscF), el poro o translocador (PopB, PopD y PcrV) y las proteínas efectoras (ExoS, ExoT, ExoU y ExoY). MI: Membrana interna, PG: Péptidoglucano, ME: Membrana externa (Modificado de Galle et al., 2012).

El T3SS de *P. aeruginosa* está conformado por 36 genes. De estos, 32 están organizados en 5 operones que codifican proteínas para la regulación, secreción y translocación, y los otros 4 genes codifican para las proteínas efectoras. Muchas de las proteínas en este sistema tienen homólogas en el T3SS de *Yersinia* sp. (Hauser, 2009). En los últimos años, el T3SS de *P. aeruginosa* es considerado como un importante factor de virulencia en infecciones agudas o crónicas (Galle et al., 2012). Su presencia se ha asociado a una alta mortalidad en 30 días en bacteremia y a una mayor gravedad en neumonía (Hauser et al., 2002; El-Sohl et al., 2012; Hattemer et al., 2013).

Las proteínas que conforman el T3SS de *P. aeruginosa* han sido identificadas (Fig. 1, Tabla 1). Por el lado de las proteínas estructurales; polímeros de las proteínas PscJ, YscJ y PscC forman el anillo de la membrana interna, el canal entre anillos en el espacio periplasmático y el anillo de la membrana externa, respectivamente (Galle et al., 2012). Además, el complejo aguja está formado por polímeros de la proteína PcsF. Esta aguja es formada incluso en ausencia de las condiciones para inducir la secreción de las proteínas efectoras. Por otro lado, las proteínas PcrV, PopB y PopD son las encargadas de la translocación. PcrV sirve como plataforma para el poro; mientras que oligómeros de PopB y PopD, previamente ensamblados, son secretados y forman el poro en la membrana del hospedero (Schoeh et al., 2003; Galle et al., 2012). La secreción de estas proteínas no requiere de inductores del T3SS (Cisz et al., 2008).

Las proteínas efectoras del T3SS de *P. aeruginosa* son las exotoxinas (Exo) S, T, U e Y. ExoS es una proteína de 49kDa doblemente funcional. En su extremo amino-terminal, tiene un dominio de activación de GTPasa; mientras que en el extremo carboxi-terminal, un dominio con actividad ADPribosil transferasa (ADPRT). Esta proteína requiere de un cofactor, la proteína FAS (de la familia 14-3-3), la cual pertenece al hospedero (Hauser, 2009). Entre sus acciones, se encuentran la inhibición de la migración y la función fagocítica de macrófagos, mediada por su actividad ADPRT (Rangel et al., 2014); ayudar a la invasión, al contribuir a evitar compartimientos ácidos intracelulares de macrófagos (Heimer et al., 2013); estimular la apoptosis en células T y monocitos, induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias en estos últimos (Galle et al., 2012); ayudar a la translocación de la bacteria por el epitelio intestinal (Okuda et al., 2010); entre otras.

ExoT es una proteína de 53kDa que es homóloga con ExoS (75% de identidad) y también comparte su bifuncionalidad. Además, al igual que ExoS, requiere del cofactor eucariote FAS (Hauser, 2009). Esta proteína es capaz de disminuir la movilidad de los macrófagos y su capacidad fagocítica; de inhibir la citoquinesis y la división celular, usando ambos dominios, etc. (Shafikhani y Engel 2006; Hauser, 2009).

Tabla 1. Proteínas del T3SS de *Pseudomonas aeruginosa*

Grupo	Proteína	Función	Masa molecular (kDa)	Referencia
Estructurales	PscN	Formación del anillo de la membrana interna	48	Galle et al., 2012
	YscJ	Conexión entre las membranas de la bacteria	27	
	PscC	Formación del anillo en la membrana externa	66	
	PscF	Principal componente del complejo aguja	9	
Translocadoras	PcrV	Conexión entre el complejo aguja y el poro	31	Moss et al., 2001
	PopB	Formación del poro	40	
	PopD	Formación del poro	34	
Efectoras	ExoS	Activadora de GTPasa y ADP ribosil transferasa	49	Hauser, 2009
	ExoT	Activadora de GTPasa y ADP ribosil transferasa	53	
	ExoY	Adenilato ciclasa	41	
	ExoU	Fosfolipasa A2	74	

La proteína ExoU tiene un peso molecular de 74kDa y tiene actividad de fosfolipasa A2. Además, es la única de las efectoras que puede encontrarse en una isla de patogenicidad (Hauser, 2009). Puede usar la superóxido dismutasa como cofactor, aunque este no es requerido (Galle et al., 2012). Por su actividad catalítica, produce la lisis celular rápidamente, pero este efecto citotóxico es más resaltante en macrófagos (Vance et al., 2005, Hauser 2009). Asimismo, puede ser ubiquitinado en la célula hospedera, aunque no es enviado a la vía de degradación (Galle et al., 2012). Es muy raro encontrar en una misma

cepa la expresión simultánea de ExoS y ExoU (Feltman et al., 2001). Por ejemplo, la cepa PAO1 no tiene ExoU; mientras que ExoS no se encuentra en la cepa PA103 (Neely et al., 2005). Finalmente, ExoY es una proteína de 41kDa con actividad nucleosil ciclasa, con preferencia en la producción de cGMP y cUMP (Beckert et al., 2014). Es capaz de realizar cambios en la morfología celular debido a que reorganiza el citoesqueleto de actina (Hauser 2009, Galle et al., 2012) y de incrementar la permeabilidad de la membrana del hospedero (Ochoa et al., 2012).

La inducción del T3SS, y en especial de las proteínas efectoras, está mediada por diferentes factores que, en líneas generales, modulan la proteína ExsA, el activador transcripcional del sistema (Galle et al., 2012). Entre estos factores, se encuentran concentraciones bajas de Ca^{2+} , contacto directo con tejidos (Diaz et al., 2011), cambios de osmolaridad, estrés, presencia de ADN dañado (Yahr y Wolfgang, 2006), niveles bajos de O_2 (O'Callaghan et al., 2011), el *quorum sensing* (Bleves et al., 2005), entre otros. En el laboratorio, se deben establecer condiciones que asemejen el contacto con la célula hospedera. El método de inducción más usado *in vitro* es el crecimiento en bajos niveles de calcio. Al disminuir el Ca^{2+} , los niveles de cAMP se incrementan, lo cual induce la expresión de la proteína Vfr que aumenta la unión de ExsA a al promotor de regulación (Yahr y Wolfgang, 2006). Asimismo, estas condiciones generan cambios en la afinidad de los represores de ExsA, lo que genera que la proteína esté libre para interactuar con los promotores (Galle et al., 2012). Para lograr estas condiciones, se usan quelantes de calcio, tales como el ácido nitrilotriacético o el ácido etilenglicol tetraacético (EGTA); y en algunos casos, se suplementa con sales de Mg^{2+} . En general, no hay solo una condición para inducir este sistema *in vitro* porque muchos parámetros deben ser optimizados, como la elección del medio, el tipo y la concentración del quelante y el tiempo de inducción (Rolsma y Frank, 2014).

I.2 Sistema inmune

El sistema inmune es el conjunto de células, tejidos y moléculas que permite reconocer y destruir agentes exógenos para resistir infecciones. Usualmente, se divide en el sistema inmune innato y adaptativo. El primero defiende en etapas iniciales de la infección

mediante el reconocimiento no específico del patógeno y se encarga de la inducción y determinación de la respuesta del sistema adaptativo; mientras que el segundo reconoce específicamente al patógeno para producir memoria a largo tiempo (Abbas et al., 2007).

En general, todas las células involucradas en la respuesta inmune, o leucocitos, son producidas y maduran a partir de precursores pluripotentes en los órganos linfoides primarios (el timo y la médula ósea). Luego son llevados por el sistema circulatorio o el linfático hacia el tejido periférico (tejido linfoide asociado a mucosa, o MALT) y a los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos y bazo) (Abbas et al., 2007). Los precursores pluripotentes pueden diferenciarse en dos tipos: mieloides y linfoides. Los mieloides son producidos en la médula ósea y pueden llegar a ser monocitos, que son precursores de macrófagos y células dendríticas; o ser granulocitos, como los neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos. En tanto, los linfoides también son producidos en la médula ósea; sin embargo, algunos maduran en ese lugar y se convierten en células o linfocitos B, mientras que otros migran al timo para madurar como células o linfocitos T (Abbas et al., 2007; Madigan et al., 2009).

I.2.1 Sistema inmune innato

El sistema inmune innato es la primera defensa del hospedero ante agentes extraños. La respuesta de este sistema comienza con las barreras físicas externas, principalmente el epitelio. Cuando los agentes externos logran pasarlo, se encuentran con los fagocitos: células especializadas en “comer” y destruir. Entre los fagocitos, se encuentran macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas inmaduras. Todos estos tienen lisosomas con diversas enzimas que les permiten realizar su función (Abbas et al., 2007; Madigan et al., 2009).

Los fagocitos reconocen a los patógenos mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que se encuentran en su membrana. Los ligandos de los PRR son los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Existen diversos tipos de PAMP,

propios de diferentes patógenos, como el lipopolisacárido, oligonucleótidos no metilados, la flagelina, el material genético de virus, entre otros (Abbas et al., 2007). La interacción del PAMP con su respectivo PRR ocasiona una respuesta en la célula inmune que facilita la fagocitosis del patógeno. Dentro del fagocito, puede producirse un incremento de la cantidad de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, conocido como explosión o *burst* respiratorio, que ayuda a destruir al agente externo (Madigan et al 2009).

Paralelamente, pueden ocurrir la inflamación y la activación del sistema del complemento. La inflamación es mediada por neutrófilos y macrófagos, los cuales son atraídos por las interleuquinas liberadas por el tejido dañado. Los neutrófilos son los primeros en llegar, destruyen las células dañadas y producen quimoquinas para atraer a los macrófagos. A su vez, estos producen citoquinas que ayudan a destruir al patógeno (Abbas et al., 2007; Madigan et al., 2009).

Por otro lado, el sistema del complemento es un conjunto de proteínas solubles en sangre que pueden reconocer y destruir a los patógenos. Existen tres vías de reconocimiento: la vía clásica, por la cual las proteínas del complemento reconocen a anticuerpos unidos al patógeno; la vía alternativa, en la cual el reconocimiento es directamente a una molécula externa del patógeno; y la vía de lectina, la cual está mediada por las lectinas de unión a manosa que se unen a glicoproteínas o glicolípidos. Luego del reconocimiento, sigue el ensamblaje y corte de diversas proteínas del patógeno, que tiene como resultado la destrucción del mismo (Abbas et al., 2007).

Finalmente, en el sistema inmune también pueden participar las células *natural killer* (NK). Estas células provienen del precursor linfoide y tienen capacidad de matar a los patógenos sin una previa activación. Además, pueden producir interferón gamma (INF- γ), el cual activa macrófagos (Abbas et al., 2007).

I.2.1.1 Respuesta innata contra *Pseudomonas aeruginosa*

Para eliminar *P. aeruginosa*, el epitelio respiratorio usa la limpieza mucociliar y puede generar señales para atraer los leucocitos y secretar sustancias antimicrobianas contra esta

(Dubis y Kolls, 2007; Lavoie et al., 2011). No obstante, la bacteria es capaz de traspasar el epitelio intestinal, ocasionando infecciones sistémicas (Okuda et al 2010). Por otro lado, entre los PRR que reconocen la bacteria están los receptores tipo Toll (TLR) 4 y 5, los cuales interactúan con el lípido A del LPS y la flagelina, respectivamente. El TLR4 es importante contra cepas causantes de infecciones crónicas en pacientes con CF (Lavoie et al., 2011). Los TLR 2 y 9, cuyos ligandos son el pili y el ADN desmetilado, respectivamente, pueden actuar contra la bacteria en menor medida (Dubis y Kolls, 2007). En tanto, se ha visto que en la respuesta innata ante *biofilms*, participan neutrófilos y macrófagos, que desencadenan *burst* respiratorio (Jensen et al., 2010).

Asimismo, los macrófagos alveolares son las primeras células inmunes que atacan a *P. aeruginosa* en el pulmón y se encargan de fagocitar al patógeno y a los neutrófilos no funcionales. La respuesta temprana ante la infección pulmonar es la producción de la interleuquina 1 β (IL1 β), la cual ayuda al reconocimiento por el inflamasoma (el complejo de proteínas y células que ocasionan inflamación). Además de lo descrito, células dendríticas, células NK y el sistema de complemento pueden atacar y destruir a *P. aeruginosa*, principalmente en cepas aisladas de infecciones crónicas en pacientes con CF (Dubis y Kolls, 2007; Lavoie et al., 2011). Finalmente, las citoquinas con mayor importancia en la modulación de la respuesta innata contra esta bacteria en infecciones pulmonares agudas son el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la interleuquina 10 (IL10) (Lavoie et al., 2011); mientras que las interleuquinas 23 y 17 (IL23 e IL17) sirven como puente entre las respuestas innata y adquirida (Dubis y Kolls, 2007).

I.2.2 Sistema inmune adaptativo

El sistema inmune adaptativo es el responsable de la defensa ante exposiciones posteriores con un mismo patógeno. Sus principales características son la especificidad y la memoria. La especificidad permite que cada patógeno sea reconocido de manera directa e individual mediante receptores capaces de reconocer una gran variedad de antígenos foráneos (moléculas perteneciente a los patógenos capaces de inducir una respuesta inmune) (Abbas

et al., 2007). Por otro lado, la memoria permite “recordar” un patógeno para posteriores exposiciones, logrando que la respuesta contra este sea más rápida y fuerte (Madigan et al., 2009).

La respuesta inmune adaptativa se puede dividir en dos tipos: mediada por células y humoral. La primera comienza con la captación del patógeno por parte de las células dendríticas o los macrófagos. Luego, estos viajan hacia el bazo o los ganglios linfáticos, mientras que degradan el patógeno para generar antígenos, los cuales son expuestos en la membrana por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). A estos órganos llegan linfocitos T no activados o *naive*, los cuales van a reconocer el antígeno expuesto mediante la interacción con su receptor de células T (TCR). Este proceso es denominado presentación de antígenos (Abbas et al., 2007; Madigan et al., 2009).

Las células T pueden dividirse en dos tipos: linfocitos T citotóxicos o CD8+ (Tc) y linfocitos T colaboradores, *helper* o CD4+ (Th). Los receptores de las células Tc interactúan con los MHC de clase I asociados a antígenos y son aquellos expresados en todas las células del hospedero, aunque estos no llegan a generar una respuesta inmune. Además de la interacción TCR – antígeno – MHC, se necesita el reconocimiento de coestimuladores en las células presentadoras para la activación. Luego ocurre la expansión clonal, donde los linfocitos Tc proliferan y se diferencian en células Tc efectoras. Estas son capaces de matar a células infectadas o a patógenos mediante la liberación de perforina, que rompe la membrana, y de granzima, que induce la apoptosis (Abbas et al., 2007).

Por otro lado, los linfocitos Th interactúan con los MHC de clase II, presentes solo en las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B). Estos requieren del reconocimiento de coestimuladores para su activación y pasan por la expansión clonal. La diferenciación de Th puede dar dos tipos de células: Th1 y Th2, lo cual dependerá del ambiente celular y el tipo de patógeno. Los linfocitos Th1 están relacionados a infecciones intracelulares y promueven la proliferación de linfocitos Tc. En cambio, los linfocitos Th2 son importantes en infecciones de organismos extracelulares y participan en la respuesta humoral (Abbas et al., 2007; Madigan et al., 2009).

La respuesta humoral está mediada por anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), que son proteínas producidas únicamente por linfocitos B. Los receptores de células B (BCR) son colocados en la membrana durante su maduración. Los BCR pueden reconocer a su antígeno específico en los tejidos linfoides periféricos. Luego del reconocimiento, el linfocito B procesa el antígeno y lo expone mediante los MHC de clase II para presentarlo a las células Th2. Se necesita la señal proveniente de los coestimuladores para la activación de estas y la producción posterior de anticuerpos, que permiten destruir al patógeno mediante la opsonización o la activación del sistema de complemento. Luego de la infección, una porción de células B permanece en circulación, lo que genera la memoria ante una exposición posterior (Abbas et al., 2007).

Los anticuerpos están compuestos por cuatro cadenas polipeptídicas divididas en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. En cada una de las cadenas, los dominios amino- y carboxi-terminal son denominados las regiones variable y constante, respectivamente. Las cadenas pesadas están compuestas de una región variable y tres o cuatro regiones constantes; mientras que las cadenas ligeras tienen una de cada tipo. En mamíferos, existen 5 clases de cadena pesada (alfa: α , delta: δ , épsilon: ϵ , gamma: γ , mu: μ) y 2 clases de cadenas ligera (lambda: λ , kappa: κ) (Abbas et al., 2007).

Existen 5 isotipos de anticuerpos en mamíferos, cada uno definidos por su cadena pesada: las inmunoglobulinas A, D, E, G y M; para las cadenas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. La IgA es el anticuerpo más abundante en secreciones (saliva, lágrimas, leche materna, entre otras), y también se lo encuentra en el epitelio respiratorio y gastrointestinal. Este anticuerpo se encuentra en forma de monómero en sangre y de dímero en secreciones, en donde se denomina inmunoglobulina A secretora (sIgA). Debido a la cantidad de tejido mucoso, la IgA es el isotipo más producido en el cuerpo, aunque no el más abundante en suero (Abbas et al., 2007; Brandtzaeg, 2010).

La IgD está asociada a células B maduras aptas para interactuar con su antígeno en tejidos periféricos. En sangre, se encuentra en forma de monómero y en poca cantidad. Se ha

reportado que interactúa con basófilos e induce la producción de pentraxina 3 e interleuquinas 1 y 4 (IL1 e IL4) (Chen et al., 2009; Madigan., et al 2009). En tanto, la IgE está asociada a alergias e infecciones por parásitos extracelulares. Una vez producidos por las células B, se unen a eosinófilos, basófilos y mastocitos hasta una exposición posterior del antígeno. En ese momento, se induce la desgranulación para producir histamina e interleuquinas inflamatorias que ayudan a combatir al parásito o al alérgeno. (Madigan et al., 2009, Fitzsimmons et al., 2014).

Por otro lado, la IgG es la más abundante en suero y es capaz de realizar diferentes mecanismos contra patógenos: aglutinación, opsonización, neutralización de toxinas, activación del sistema de complemento, entre otros. Es el isotipo más importante en respuesta secundaria y es el único capaz de pasar la placenta (Abbas et al., 2007; Madigan et al., 2009; Vidarsson et al., 2014). Finalmente, la IgM se encuentra presente en células B inmaduras. Es la única que se encuentra en suero en forma de pentámero o hexámero. Ante una infección bacteriana, es el primer isotipo en ser producido y es capaz de activar el sistema de complemento, incluso con más fuerza que la IgG (Abbas et al., 2007; Madigan et al., 2009).

I.2.2.1 Respuesta adaptativa contra *Pseudomonas aeruginosa*

El sistema inmune es capaz de generar respuesta adaptativa contra *P. aeruginosa*. En cuanto a la respuesta mediada por células, las células dendríticas mieloides tienen un rol importante en las infecciones crónicas de esta bacteria. Además, las células Tc productoras de interleuquina 17 (IL17), una citoquina proinflamatoria (Lavoie et al., 2011) están presentes comúnmente; mientras que el tipo de respuesta Th que está más presente en infecciones asociadas a CF aún no está claro (Jensen et al., 2010).

Por otro lado, existen diversos reportes sobre la respuesta humoral ante *P. aeruginosa*. Moya et al. (2007) identificaron IgG contra LPS, elastasa y proteasa alcalina mediante ELISA en sueros de 11 pacientes con sepsis nosocomial, 5 con CF y 2 con infección

respiratoria. En todos los casos, los títulos fueron mayores a los encontrados en sueros de personas sanas. En tanto, Dođru et al. (2013) analizaron la presencia de IgG contra la exotina A, la elastasa y la proteasa alcalina en suero de pacientes con CF (24 con infección crónica de *P. aeruginosa*, 13 con infección intermitente y 37 sin infección) utilizando ELISA. La frecuencia de estos anticuerpos varió principalmente por el tipo de paciente, en lugar de por el antígeno. Se encontraron estos anticuerpos en el 62.5 – 75%, 30.8 – 38.5% y 8.1 – 16.2% del grupo con infección crónica, con infección intermitente y sin infección, respectivamente.

También existen estudios previos de la generación de anticuerpos contra las proteínas del T3SS de *P. aeruginosa*, principalmente en pacientes con CF. Por ejemplo, Moss et al. (2001) analizaron sueros de 33 adultos con CF. Mediante Western blot y encontraron anticuerpos contra PopB, PopD, PcrV y ExoS en 90.9, 72.7, 66.7 y 33.3% de los sujetos, respectivamente. Mientras tanto, Banwart et al. (2002) examinaron 33 sueros de pacientes pediátricos con CF para buscar IgG contra ExoS, PcrV y PopB usando Western blot, y encontraron dichos anticuerpos en el 53.8, 38.5 y 53.8% de los sueros, respectivamente. De manera similar, Corech et al. (2005) investigaron la presencia de anticuerpos contra esas mismas proteínas en 48 niños con CF usando ELISA y Western blot. Con la primera técnica, se encontró IgG contra ExoS, PcrV y PopB en el 94, 83 y 94% de los niños respectivamente; mientras que con la otra técnica, 90, 85 y 94%, respectivamente. Asimismo, Cruz et al. (2012) evaluaron 22 pacientes con CF y 28 pacientes sanos mediante Western blot y detectaron anticuerpos contra ExoS, ExoT, PopB y PopD entre el 75 y 100% de los sueros de pacientes con CF; mientras que en el otro grupo, entre 18 y 36%.

Finalmente, se ha reportado la presencia de IgG e sIgA contra el alginato y antígeno estándar (sonicado de 17 serotipos de *P. aeruginosa*) en saliva, suero sanguíneo y secreciones nasales de pacientes con CF distribuidos en 3 grupos: 32 sin infección de la bacteria, 24 con colonización intermitente y 25 con infección crónica. En todos los casos, los títulos en los pacientes sin infección fueron menores respecto a aquellos con la colonización intermitente o la infección crónica, principalmente en los niveles de sIgA en secreciones nasales y saliva (Aanaes et al., 2013).

I.2.3 Leche materna y calostro

Los recién nacidos presentan una inmadurez inmunológica, es decir, los procesos descritos anteriormente no ocurren con normalidad. Por otro lado, no presentan anticuerpos propios debido al poco tiempo de exposición (Brandtzaeg, 2010). Por tanto, además de las IgG provenientes de la madre que atravesaron la placenta, uno de los medios de protección que tienen contra las infecciones es la leche materna (Field, 2005).

La leche materna está compuesta de carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales y otras macromoléculas. La abundancia de los componentes cambia a través del tiempo. Por ejemplo, en la leche materna de la primera semana o calostro, existe una gran cantidad de proteínas; mientras que en la leche madura (la leche materna luego de un mes), predominan los lípidos y la lactosa (Turin y Ochoa, 2014). La alta concentración de proteínas en el calostro refleja su función protectora en el recién nacido.

El calostro confiere diversos factores protectores: oligosacáridos, glicoproteínas, probióticos, células y moléculas inmunológicas, entre otros (Ballard y Morrow, 2013; Turin y Ochoa, 2014). Los oligosacáridos tienen la función de prebióticos y pueden prevenir la unión de patógenos al epitelio intestinal (Bode, 2009). Por otro lado, la lactoferrina es la segunda proteína más abundante en leche, y se ha reportado que tiene actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, inmunomoduladora y efecto protector contra enteropatógenos (Ochoa y Clearly, 2009). Mientras tanto, la mucina, otra glicoproteína, puede disminuir la adhesión de patógenos (Peterson et al., 2013). En tanto, los probióticos más abundantes en leche materna son *Bifidobacterium* sp, *Lactobacillus* sp, *Enterococcus* sp, entre otros. Entre los efectos antimicrobianos de estos destacan la reducción de la permeabilidad intestinal, la competencia por nutrientes y receptores en epitelio intestinal, entre otros (Lara-Villoslada et al., 2007). Asimismo, entre las células inmunológicas se encuentran los macrófagos, los mastocitos, linfocitos T y células NK (Ballard y Morrow, 2013; Turin y Ochoa, 2014). Por último, existen anticuerpos en la leche materna, entre las que se encuentran IgG, IgM y principalmente, sIgA (Turin y Ochoa, 2014).

Las inmunoglobulinas A secretora (sIgA) son el isotipo de anticuerpo más abundante en la leche materna (Morrow y Rangel, 2004). Las células B de los tejidos linfáticos asociados al tracto intestinal (GALT) y respiratorio (NALT) de la madre intervienen en la producción de sIgA. Estas migran hacia el tejido mamario por el sistema linfático y producen dímeros de IgA (Brandtzaeg, 2010). Este dímero se une al receptor de poli-inmunoglobulina (pIgR) en la cara basolateral del epitelio y es llevado a través de la célula epitelial por endocitosis. Una vez en la membrana apical, el pIgR es cortado para liberar el anticuerpo a la leche. La porción del pIgR que queda remanente en el dímero se denomina el componente secretorio (SC), el cual protege al anticuerpo de la proteólisis y la degradación por pH ácido (Hurley y Theil, 2011; Corthésy, 2013). Por tanto, las sIgA en la leche reflejan la exposición a antígenos que ocurrió en los tractos intestinal y respiratorio de la madre (Brandtzaeg, 2010; Breakley et al., 2015).

No obstante, una vez consumidas por el recién nacido, las sIgA del calostro no pueden ser internalizadas; por lo que su función protectora solo se cumple en el intestino del niño (Hurley y Theil, 2011). Entre las propiedades protectoras de las sIgA se encuentran bloquear toxinas y receptores de las bacterias en el epitelio intestinal, prevenir la adherencia del patógeno, modular la composición de la microbiota, estimular la maduración del GALT, promover el transporte de antígenos a las células dendríticas del recién nacido, entre otras (Mantis, 2011; Corthésy, 2013).

Se han realizados diversos estudios para identificar los antígenos contra los cuales actúan las sIgA del calostro (Tabla 2). El ELISA y el Western blot son las técnicas que se más usan para este fin. Además, muchos de estos estudios tienen al LPS como antígeno de estudio, o no especifican cuál es. Para *P. aeruginosa*, solo se ha encontrado sIgA contra el lisado celular y contra su LPS en calostro.

Tabla 2. Trabajos sobre la detección de inmunoglobulinas A secretoras (sIgA) en muestras de leche y sus antígenos.

Organismo	Método de detección	Antígeno	Tipo de muestra	Tamaño de muestra	Lugar de procedencia	Referencia
<i>Streptococcus mutans</i>	Aglutinación	LPS	Calostro	8	No indica	Arnold et al., 1976
<i>Escherichia coli</i> / <i>Vibrio cholerae</i>	Inhibición del ensayo de acumulación de fluído en íleon de conejo	Enterotoxina	Calostro	Pool de 20	Guatemala	Stoliar et al., 1976
			Leche madura	Pool de 19	Guatemala / Ohio	
Rotavirus	ELISA	No especifica	Calostro	62	Costa Rica / Washington / Guatemala	Yolken et al., 1978
			Leche madura	95	Guatemala	
<i>Shigella</i> sp. / <i>Salmonella</i> sp. / <i>E. coli</i> / <i>Pseudomonas aeruginosa</i> / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aglutinación pasiva	LPS	Calostro	Pool de 20	No indica	Funakoshi et al., 1981
Polivirus / Virus Cocksackie B	Test de neutralización	No especifica				
<i>K. pneumoniae</i>	ELISA	Pili tipo 1	Calostro	21	Texas	Davis et al., 1982
<i>V. cholerae</i>	ELISA	LPS / Enterotoxina	Calostro	Pool de 15	India	Majumdar y Ghose, 1982

<i>Chlamydia trachomatis</i>	ELISA	No específica (Lisado celular)	Calostro Leche madura	30 6	Noruega	Skaug et al., 1982
<i>Clostridium difficile</i>	Actividad neutralizante en células adrenales Y1	Toxina A / Toxina B	Calostro	56	Texas	Kim et al., 1984
<i>Bordetella pertussis</i>	ELISA	Hemaglutinina filamentosa / Factor promotor de linfocitosis	Calostro	60	Indonesia	Oda et al., 1985
<i>E. coli</i>	ELISA	Polisacárido O	Calostro	47	Australia	Sennhauser et al., 1989
<i>Shigella flexneri</i>	ELISA y Western blot	No específica (Antígenos plásmidicos)	Calostro Leche madura	43 57	Houston / México	Cleary et al., 1991
<i>Shigella sp. / Plesiomonas shigelloides / Salmonella sp.</i>	ELISA	LPS	Calostro Leche de transición Leche madura	453 26 210	Costa Rica / Suecia / Vietnam Suecia Costa Rica / Suecia / Vietnam	Achí et al., 1992
<i>Shigella sp.</i>	ELISA	LPS	Calostro	7	México	Hayani et al., 1992
<i>P. aeruginosa / E. coli</i> <i>E. coli / Salmonella sp.</i>	ELISA	LPS Lípido A	Calostro y Leche madura	94	Alemania	Feist et al., 2000

EPEC	ELISA y Western blot	BfpA / EspA / EspB / Intimina	Calostro	21	México	Parissi-Crivelli et al., 2000
EAEC	ELISA y Western blot	Adhesina fimbrial agregativa II	Calostro	35	Brasil	Fernandes et al., 2001
<i>E. coli</i> / <i>Staphylococcus</i> sp. / <i>Salmonella</i> sp. / <i>Vibrio parahemolyticus</i> / <i>P. aeruginosa</i> / <i>Campylobacter jejuni</i> / <i>Listeria monocytogenes</i> / <i>Yersinia enterocolitica</i> / <i>Clostridium perfringens</i>	ELISA	No especifica (Lisado celular)	Calostro	36	Japón	Takahashi et al., 2002
			Leche de transición	71		
EPEC / EHEC	ELISA y Western blot	EspA / EspB / Intimina gamma / LPS / Stx1	Calostro	27	México / Virginia	Noguera-Obenza et al., 2003
			Leche de transición	73		
			Leche madura	23		
EPEC / ETEC / EHEC / EIEC / <i>Streptococcus pneumoniae</i> / <i>Haemophilus influenza</i>	Western blot	No especifica (Extracto crudo)	Calostro	Pool	Brasil	Carbonare et al., 2005
			Leche madura	Pool		
EPEC / EHEC	ELISA y Western blot	No especifica (Extracto crudo)	Calostro	51	Brasil	Palmeira et al., 2005
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium <i>Shigella flexneri</i> EPEC	Western blot	Operón Sip Operón Ipa EspA-D	Calostro	76	Perú	Durand et al., 2013

EPEC	Western blot	Tir / EspB / EspC / Intimina / Hsp10	Leche de transición	Pool	México	Gavilanes-Parra et al., 2013
Rotavirus	ELISA	No especifica (Extracto crudo)	Calostro Leche madura	30 30	Brasil	Tino de Franco et al., 2013

[†]EPEC: *E. coli* enteropatogénica, EAEC: *E. coli* enteroagregativa, EHEC: *E. coli* enterohemorrágica, ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, EIEC: *E. coli* enteroinvasiva.

I.3 Planteamiento del problema

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que causa diversas enfermedades, entre ellas, la sepsis neonatal, que tiene alta tasa de mortalidad (Stoll et al., 2002). Su variedad de efectos se debe a sus factores de virulencia, entre los que destaca el sistema de secreción tipo III (T3SS) (Hauser, 2009). Se ha encontrado anticuerpos contra las proteínas del T3SS en suero de pacientes con CF (Mauch y Levy, 2014).

Por otro lado, en los recién nacidos, debido a la inmadurez de su sistema inmune, la principal fuente de protección son los anticuerpos presentes en el calostro, fundamentalmente, las inmunoglobulinas A secretoras (sIgA) (Brandtzaeg, 2010). En leche materna, solo se ha encontrado anticuerpos contra el lisado celular de *P. aeruginosa* o contra su LPS; mas no contra otras proteínas, como las del T3SS (Tabla 2).

En este trabajo se propone buscar sIgA contra las proteínas del T3SS de *P. aeruginosa* en calostro de mujeres peruanas. La presencia de este tipo de anticuerpos, junto con una práctica adecuada de la lactancia materna, puede ayudar a proteger a los recién nacidos ante las infecciones causadas por esta bacteria en donde su T3SS cumple un rol importante.

II. Hipótesis y Objetivos

II.1 Hipótesis

En el calostro de las mujeres peruanas, existen sIgA contra las proteínas ExoS, ExoT, PopB y PopD del sistema de secreción tipo III de *Pseudomonas aeruginosa*.

II.2 Objetivos

II.2.1 Objetivo general

Determinar si las inmunoglobulinas A secretora (sIgA) contra las proteínas del sistema de secreción tipo III (T3SS) de *Pseudomonas aeruginosa* están presentes en el calostro de mujeres peruanas.

II.2.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* PAO1 y la inducción de la expresión del T3SS.
2. Estandarizar las condiciones (concentración de anticuerpos, protocolo y método de revelado) del Western blot para detectar la presencia de sIgA contra ExoS, ExoT, PopB y PopD de *P. aeruginosa*.
3. Determinar la abundancia de sIgA contra ExoS, ExoT, PopB y PopD en el calostro de mujeres peruanas.
4. Obtener una medida semicuantitativa (intensidad de las bandas) de las sIgA contra ExoS, ExoT, PopB y PopD en el calostro de mujeres peruanas.

III. Materiales y Métodos

III.1 Muestras de calostro

Las muestras de calostro utilizadas provinieron de dos estudios previos y se encuentran almacenadas en el banco de muestras clínicas del Laboratorio de Infectología Pediátrica (Laboratorios de Investigación y Desarrollo [LID], UPCH). Setenta y cinco muestras fueron recolectadas en un trabajo anterior en el Hospital Nacional Cayetano Heredia que evaluó la presencia de anticuerpos en calostro contra EPEC, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium y *Shigella* sp (Durand et al., 2013). Otras 277 muestras de calostro fueron recolectadas como parte de un estudio de evaluación de lactoferrina bovina en la prevención de sepsis neonatal en tres hospitales de Lima: Hospital Nacional Cayetano Heredia, Hospital Nacional Daniel Sabogal Sologuren y Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (Ochoa *et al.*, NIH, RO1-HD067694; Turin et al., 2014). En el primer trabajo, los criterios de inclusión fueron madres mayores de 18 años que dieron a luz después de las 37 semanas de gestación. En el segundo, los criterios de inclusión fueron aquellas madres que aceptaron la participación de sus recién nacidos en el ensayo clínico de lactoferrina, con el criterio de ser prematuros con un peso de nacimiento menor de 2000g y ser enrolados dentro de los primeros 3 días de vida.

Todas las muestras se obtuvieron dentro de la primera semana después del parto por la técnica de extracción manual de Marmet (Marmet, 1981). Se colectó entre 3 a 5 ml de las muestras y estas fueron depositadas en frascos estériles para su posterior procesamiento. El calostro fue centrifugado a 17000 g por 15 min y la porción lipídica fue cuidadosamente retirada. Se tomaron alícuotas del suero que fueron almacenadas a -20°C.

Para este trabajo, se usaron todas las muestras del primer proyecto y 75 muestras escogidas al azar del segundo proyecto. Las muestras fueron codificadas para su uso, es decir, se prescindió de la identidad de la madre en todo momento y los resultados fueron incorporados al banco de datos correspondiente. Los dos proyectos mencionados y este trabajo han sido aprobados por el Comité de Ética Institucional de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI 56721, 57710 y 63687, respectivamente).

III.2 Crecimiento bacteriano

Se trabajó con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ATCC 15692; donada por Dr. Joaquín Ruiz, Universidad de Barcelona) (Holloway, 1955). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 es una cepa de referencia de laboratorio y es poca virulenta. Esta cepa expresa todas las proteínas del T3SS, excepto la proteína ExoU (LaBauve y Wargo, 2012). Además, expresa mayor cantidad de proteasas respecto a otras cepas de referencia como PAK y PA103 (Rolsma y Frank, 2014). No obstante, las sublíneas provenientes de la cepa original han sufrido mutaciones en diferentes genes, incluyendo aquellos para el T3SS (Klockgether et al., 2010). La cepa fue criopreservada en infusión cerebro-corazón (BHI) suplementado con 15% glicerol a -70°C.

Para determinar el tiempo en el cual la cepa *P. aeruginosa* PAO1 llega al inicio de la fase estacionaria, se analizó su crecimiento midiendo la turbidez del medio a través de la densidad óptica a 600 nm (OD 600nm). Para este fin, la cepa fue descongelada y sembrada en Agar MacConkey a 37°C por una noche. Luego, se cultivó entre 1 y 5 colonias por una noche en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C y 125 rpm de agitación. Al día siguiente, el cultivo fue diluido en caldo LB fresco hasta que la OD 600nm fuera entre 0.1 y 0.2. Luego, se repartió en alícuotas de 20ml y se las dejó a 37°C y 250 rpm de agitación por 8 horas. En cada hora, se midió la OD 600nm de una de las alícuotas. Se repitió este experimento 4 veces. Finalmente, se elaboró la curva de crecimiento (OD 600nm vs. tiempo) usando los promedios de las densidades ópticas a cada hora y se calculó el tiempo de duplicación según lo indicado por Mandsberg et al. (2009).

III.3 Precipitación de proteínas

Para la precipitación de proteínas de la cepa *P. aeruginosa* PAO1, se dejó crecer según lo descrito en la sección anterior hasta el tiempo determinado. Después, se precipitaron las proteínas secretadas según Komoriya et al. (1999), con algunas modificaciones. En resumen, el cultivo bacteriano se centrifugó a 17000 g por 15min. Luego, se separó de 1.5 a 6ml del

sobrenadante y se le agregó ácido tricloroacético (TCA) al 25% v/v (concentración final de 3.75% v/v) para precipitar las proteínas. Esta mezcla se incubó por una noche a 4°C y después, se centrifugó a 17000 g por 15min. El sobrenadante se descartó y el precipitado de proteínas se disolvió en “buffer” de carga. Este buffer estuvo compuesto por buffer Tris-HCl 245mM (pH 6.8), β-mercaptoetanol al 5%, glicerol al 40%, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 8% y azul de bromofenol al 0.04%. Finalmente, las proteínas se almacenaron a -20°C. El procesamiento de las proteínas fue como máximo una semana después de la precipitación debido a que no se usaron inhibidores de proteasas. Tampoco fue posible cuantificar las proteínas precipitadas.

Para determinar el volumen de sobrenadante adecuado para la extracción de proteínas, se realizó una electroforesis desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). En esta, las concentraciones del gel concentrador (“stacking gel”) y el gel separador (“resolving gel”) fueron de 10 y 12.5 %, respectivamente. El agente reductor fue el β-mercaptoetanol, presente en el “buffer” de carga. La desnaturalización de las proteínas se aseguró mediante una incubación a 95°C y por el SDS del “buffer” de carga. El gel se reveló mediante la tinción con azul de Coomassie. Finalmente, se eligió el volumen de sobrenadante con el perfil de proteínas más nítido.

III.4 Estandarización de la inducción del T3SS

Para determinar las condiciones para inducir el T3SS, se utilizó lo descrito por Shen et al. (2008), con algunas modificaciones. La cepa *P. aeruginosa* PAO1 se cultivó por una noche en caldo LB a 37°C y en agitación moderada. Al día siguiente, el cultivo fue diluido en caldo LB solo o suplementado con EGTA 2.5, 5 o 7.5mM, con o sin MgCl₂ 10mM; hasta que la OD 600 nm estuvo entre 0.1 y 0.2. Luego se dejó crecer a 37°C y en agitación hasta llegar a un OD_{600nm} de 1.4. Posteriormente, se precipitaron las proteínas secretadas usando 2.5ml de sobrenadante según la metodología descrita anteriormente y se realizó una SDS-PAGE, bajo las condiciones antes descritas.

III.5 Estandarización del Western blot

Para la estandarización del Western blot (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981), se utilizaron diferentes protocolos, descritos en la Tabla 3. Se determinaron las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios, las soluciones y tiempos de las etapas del Western blot, así como el método de revelado.

Tabla 3. Protocolos utilizados para la estandarización del Western Blot. Diferentes soluciones buffers (TBS: buffer Tris salino, PBS: buffer fosfato salino), suplementaciones y tiempos de incubación fueron evaluados.

Etapas	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Bloqueo	TBS, 0.05% Tween 20, 3% Leche 2 horas	PBS, 5% Leche Una noche	PBS, 5% Leche Una noche
Lavado	TBS, 0.05% Tween 20 3 veces por 5 min	-	PBS 2 veces por 5 min
Anticuerpo Primario	TBS, 0.05% Tween 20, 1% Leche Una noche	PBS, 0.05% Tween 20, 5% Leche 1 hora	PBS, 0.05% Tween 20, 5% Leche 1 hora
Lavado	TBS, 0.05% Tween 20, 1% Leche 3 veces por 5 min	PBS, 5% Leche 3 veces por 5 min	PBS 3 veces por 5 min
Anticuerpo Secundario	TBS, 0.05% Tween 20, 1% Leche 2 horas	PBS, 0.05% Tween 20, 5% Leche 1 hora	PBS, 0.05% Tween 20, 5% Leche 1.5 horas
Lavado	TBS, 0.05% Tween 20 3 veces por 5 min TBS, pH 8 3 veces por 5 min	PBS, 5% Leche 3 veces por 5 min TBS, pH 8 30 min	PBS 3 veces por 5 min TBS, pH 8 30 min
Referencia	Durand et al., 2013	Hauser A (Com. personal)	Este trabajo

III.5.1 Concentración de anticuerpos

Para determinar las concentraciones adecuadas de los anticuerpos primarios y secundarios, se precipitaron las proteínas secretadas según lo determinado en “Estandarización de la inducción del T3SS”. Posteriormente, se realizó una SDS-PAGE al 12.5% y una transferencia electroforética hacia una membrana de nitrocelulosa (0.45um de tamaño de poro).

Luego, se realizó el Western Blot según el Protocolo 1 (Tabla 3). En detalle, luego del bloqueo, la membrana fue colocada en el sistema de soporte “Mini-PROTEAN II Multiscreen Apparatus” (Bio Rad, California, Estados Unidos). Este sistema permite evaluar múltiples muestras haciendo uso de canaletas individuales de volumen pequeño. Posterior al primer lavado, se agregó 300 ul de las diluciones de anticuerpo primario a cada pocillo del soporte. Se utilizó como anticuerpo primario una mezcla de anticuerpos policlonales contra ExoU, ExoS, ExoT, PopB y PopD (proporcionados por Dr. Alan Hauser, Northwestern University; Hauser et al., 2002). Los anticuerpos policlonales fueron preparados individualmente por la inyección a conejos de cada proteína extraída y purificada a partir de una SDS-PAGE, y luego fueron mezclados equimolarmente (Hauser et al., 1998; Hauser et al., 2002). Asimismo, se usó una mezcla equimolar de 10 muestras de calostros escogidas al azar (“pool” de calostro). Los anticuerpos primarios se diluyeron en distintos factores respecto a las soluciones originales: desde 1/5000 a 1/100 para los anticuerpos policlonales y desde 1/400 a 1/10 para el calostro.

Después del segundo lavado, se agregó 300ul de las diluciones de anticuerpo secundario a cada pocillo del soporte. Se utilizaron, como anticuerpos secundarios: una solución de anticuerpos contra inmunoglobulina G de conejo (anti-IgG; Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) y una solución de anticuerpos contra inmunoglobulina A humano (anti-IgA; Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), ambos conjugados con peroxidasa, para los anticuerpos policlonales o el calostro, respectivamente. Estos se diluyeron en distintos factores respecto a las soluciones originales: desde 1/5000 a 1/200 para los anti-IgG y desde

1/500 a 1/200 para los anti-IgA. Finalmente, luego del tercer lavado, la detección colorimétrica de la membrana se hizo por la reacción con 4-cloro naftol (Bio Rad, California, Estados Unidos; Hawkes et al., 1982).

III.5.2 Protocolo de Western blot

Para determinar las soluciones y los tiempos de incubación para cada etapa del Western blot, se realizaron por separado los tres protocolos indicados en la Tabla 3. La obtención y procesamiento de las proteínas, así como los volúmenes de los anticuerpos que se añadieron a cada pocillo, no variaron respecto a lo descrito en “Concentración de anticuerpos”. Se usó como anticuerpos primarios la mezcla de anticuerpos policlonales y el “pool” de calostro, diluidas a 1/100 y 1/10, respectivamente. Además, los anticuerpos secundarios (anti-IgG y anti-IgA) fueron diluidos a 1/200. La detección colorimétrica de la membrana se realizó mediante la reacción con 4-cloro naftol.

III.5.3 Técnica de detección colorimétrica

Para determinar la reacción colorimétrica para la membrana, se realizó el Western Blot según lo indicado en el Protocolo 3 (Tabla 3). La obtención y procesamiento de las proteínas, así como los volúmenes de los anticuerpos que se añadieron a cada pocillo, no variaron respecto a lo descrito en “Concentración de anticuerpos”. Se usó como anticuerpos primarios la mezcla de anticuerpos policlonales, el “pool” de calostro y 5 muestras individuales escogidas al azar, diluidas a 1/100 para los anticuerpos policlonales y 1/10 para los calostros. Además, los anticuerpos secundarios (anti-IgG y anti-IgA) fueron diluidos a 1/200. La detección de la membrana se realizó mediante la reacción con 4-cloro naftol o con diaminobencidina (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos; Glass et al., 1981).

III.6 Análisis de muestras

Para determinar la presencia de sIgA contra las proteínas del T3SS de *P. aeruginosa*, se realizaron Western Blot a cada uno de las muestras de calostro según las condiciones determinadas anteriormente. Como control positivo, se usó la mezcla de anticuerpos policlonales. Tres personas analizaron las membranas reveladas para definir si las bandas presentes correspondían a un resultado positivo. En su decisión, se ayudaron del perfil de los anticuerpos policlonales y los pesos moleculares. Se consideró la presencia positiva de un anticuerpo si hubo coincidencia de al menos 2 personas. Finalmente, se midió la intensidad de las bandas con el programa Image Lab Software 3.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., California, Estados Unidos) para obtener una medida aproximada de la cantidad de sIgA.

III.7 Análisis estadístico

La presencia de los anticuerpos contra cada proteína y la intensidad de sus respectivas bandas fueron calculadas para cada tipo de población (a término y pretérmino), así como en la muestra total; y fueron reportadas como porcentaje y mediana, respectivamente. Se comparó las frecuencias y las intensidades entre las dos poblaciones utilizando la prueba de chi cuadrado y la prueba U de Mann-Whitney (suma rango de Wilcoxon), respectivamente. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p menor a 0.05.

Con el fin de realizar un análisis exploratorio, se evaluó la asociación entre la presencia de los anticuerpos contra cada proteína y las características de la madre (edad materna, edad gestacional, número de embarazos, número de paridad y el tiempo de la toma de muestra) mediante una regresión logística múltiple. Se calcularon los “odds ratio” (OR) para cada característica y sus intervalos de confianza. Un OR se consideró estadísticamente significativo si el valor de 1 no estaba presente en el intervalo de confianza. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa Stata 12 (StataCorp LP, Texas, Estados Unidos).

IV. Resultados

IV.1 Característica de la población

Las características de las madres e hijos cuyas muestras fueron escogidas en este trabajo son descritas en la Tabla 4. La mediana del peso al nacer, la edad de la madre y la edad gestacional fueron de 2025 g, 26 años y 37 semanas, respectivamente. Hubo una diferencia significativa en el peso al nacer de los recién nacidos, la edad gestacional y la edad de la madre entre los grupos escogidos, según lo esperado.

Por otro lado, 89 muestras (52.7%) fueron tomadas antes de los 4 días; mientras que 73 madres (48.7%) tuvieron un hijo nacido vivo en los estudios originales. Además, 61 madres (40.7%) fueron primigestas. Finalmente, 104 madres (69.3%) tuvieron un parto abdominal o por cesárea, siendo mayor la proporción de este tipo de parto en el grupo de madres con hijos pretérmino.

Tabla 4. Características de las poblaciones en estudio.

Característica	A término (n = 75)	Pretérmino (n = 75)	Total (n = 150)
Peso al nacer (g)¹	3455 (3150 - 3840)	1750 (1650 - 1912)	2025* (1750 - 3455)
Edad de la madre (años)¹	24 (20 - 29)	29 (25 - 35)	26* (22 - 32)
Edad gestacional (semanas)¹	40 (39 - 40)	33 (32 - 34)	37* (30 - 40)
Tiempo de toma de la muestra (días)²			
	2 32 (42.7 %)	8 (10.7 %)	40* (26.7 %)
	3 24 (32.0 %)	15 (20.0 %)	39 (26.0 %)
	4 12 (16.0 %)	17 (22.7 %)	29 (19.3 %)
	5 7 (9.3 %)	16 (21.3 %)	23* (15.3 %)
	6 - 7 -	19 (25.3 %)	19 (12.7 %)

Número de nacidos vivos²			
1	40 (53.3 %)	33 (44.0 %)	73 (48.7 %)
2	17 (22.7 %)	22 (29.3 %)	39 (26.0 %)
3	14 (18.7 %)	14 (18.7 %)	28 (18.7 %)
4 - 6	4 (5.3 %)	6 (8.0 %)	10 (6.6 %)
Número de gestaciones²			
1	34 (45.3 %)	27 (36.0 %)	61* (40.7 %)
2	19 (25.3 %)	20 (26.6 %)	39 (26.0 %)
3	14 (18.7 %)	14 (18.7 %)	28 (18.7 %)
4 - 8	8 (10.7 %)	14 (18.7 %)	24 (14.6 %)
Tipo de parto²			
Eutócico	29 (38.7 %)	17 (22.7 %)	46* (30.7%)
Abdominal	46 (61.3 %)	58 (77.3 %)	104 (69.3 %)

¹ Mediana (Rango Intercuartílico), ² Cantidad (Porcentaje).

* $p < 0.05$ (A término vs. Pretérmino).

IV.2 Crecimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

El crecimiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 fue analizado por 8 horas en caldo Luria-Bertani (LB) a 37°C y 250 rpm, midiendo su densidad óptica a 600nm (OD 600nm). La curva de crecimiento se presenta en la Fig. 2. En los cuatro experimentos, la desviación estándar de los OD 600nm obtenidos en cada hora fue baja (0 a 0.06). Asimismo, se notó que estos valores y la coloración verduzca del cultivo siempre aumentaron con el tiempo.

Por otro lado, la ecuación de la recta formada al realizar una gráfica semilogarítmica de las OD 600nm versus el tiempo fue $y = 0.3332x - 0.934$; por lo que el tiempo de duplicación de la bacteria fue 20 min.

A las 5 horas de crecimiento, se encontró una OD 600nm de 1.4 y se eligió estos dos datos como los característicos en la fase temprana del crecimiento estacionario de la cepa estudiada.

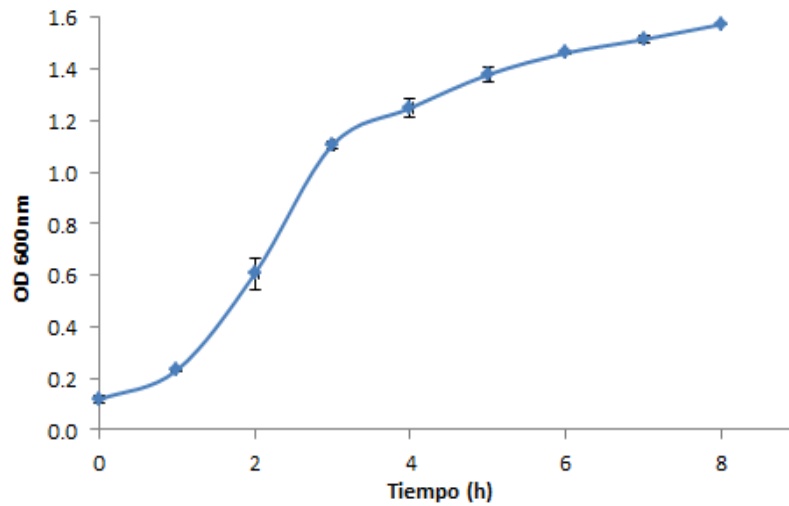


Figura 2. Curva de crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1. Un cultivo de una noche de la cepa fue diluido en caldo LB y se midió el OD 600nm durante 8h. Los datos son el promedio de 4 réplicas y las barras de error representan la desviación estándar.

IV.3 Efecto del volumen del sobrenadante en la extracción de proteínas.

Luego de dejar crecer la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 por 5 horas en caldo LB a 37°C y 250rpm, se centrifugó el cultivo a 17000g por 15 min y se alicuotaron diferentes volúmenes de sobrenadante (1.5 a 6ml). Se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético en frío y se hizo una electroforesis en poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5%, cuyo resultado se observa en la Fig. 3.

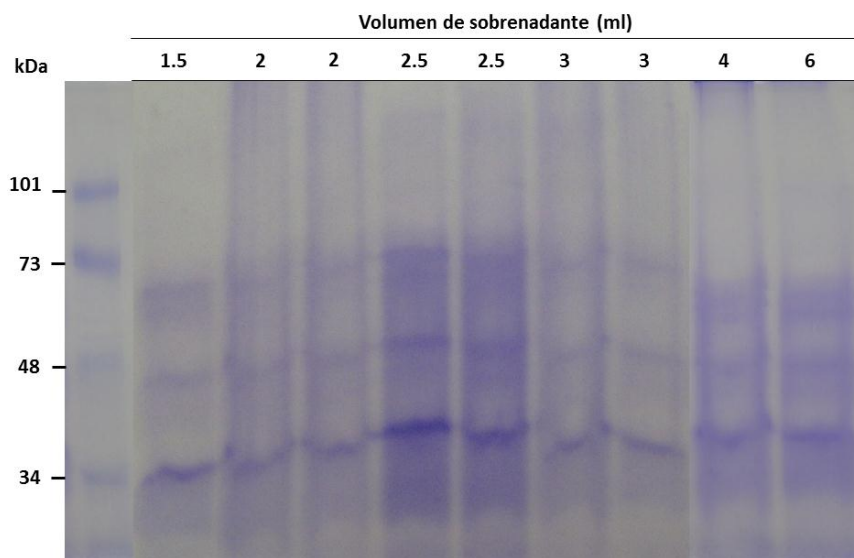
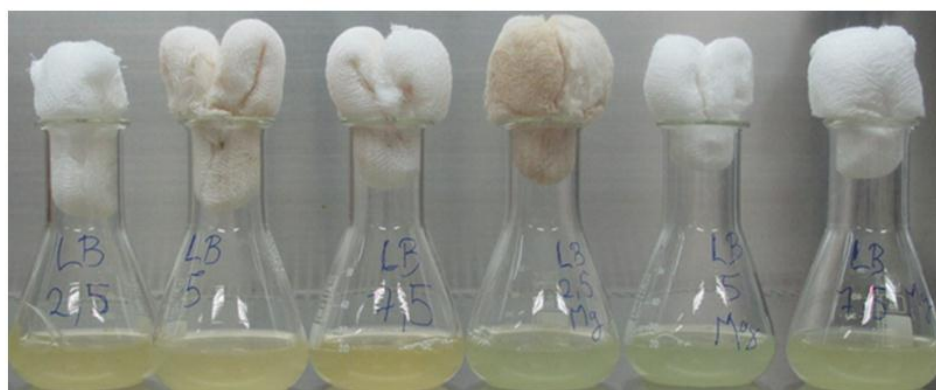


Figura 3. Estandarización de la extracción de proteínas. SDS-PAGE al 12.5% de las proteínas precipitadas de diferentes volúmenes de sobrenadante provenientes de la centrifugación del cultivo de 5h en caldo LB de *P. aeruginosa* PAO1. El gel fue teñido con azul de Coomassie. El volumen de sobrenadante utilizado en cada carril está indicado en la parte superior.

En todos los carriles, se observaron 3 bandas principales; sin embargo, solo en los carriles de 2.5 y 3ml de sobrenadante, se pudo notar otras bandas tenues. Asimismo, la intensidad de las bandas aumentó conforme el volumen utilizado; aunque con 2.5 ml, la intensidad y la nitidez de las bandas fue la mayor respecto a los otros volúmenes. Por lo mismo, se decidió usar 2.5ml de sobrenadante en los siguientes experimentos para obtener un perfil más adecuado.

IV.4 Efecto del EGTA y Mg^{2+} en la inducción del sistema de secreción tipo III

Un cultivo de una noche de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 se diluyó en caldo LB solo o suplementado con distintas concentraciones de EGTA y en presencia o no de $MgCl_2$ 10mM. Después de 5 horas a 37°C y agitación moderada, se midió el OD 600nm y los resultados se presentan en la Fig. 4.



OD 600nm	1.041	0.962	0.690	1.436	1.421	1.391
EGTA (mM)	2.5	5	7.5	2.5	5	7.5
MgCl ₂ (mM)	0	0	0	10	10	10

Figura 4. Crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 a distintas condiciones de EGTA y Mg²⁺. Se diluyó un cultivo de una noche de la cepa en caldo LB suplementado con distintas concentraciones de EGTA (2.5, 5 o 7.5 mM) y en presencia o no de MgCl₂ 10mM. La imagen y los OD 600nm mostrados fueron obtenidos inmediatamente después de 5 horas de crecimiento a 37°C y agitación moderada.

El crecimiento con EGTA y sin MgCl₂ no permitió llegar a la OD 600nm esperada de 1.4 a las 5h, en cualquier concentración de EGTA. Además, se notó que a mayor concentración de EGTA, menor fue el valor de OD 600nm obtenido; incluso en presencia de MgCl₂. Esta tendencia también se notó en la coloración verde luego del crecimiento (Fig. 4).

Debido a que la intensidad de la banda está relacionada a la cantidad de proteína, se dejó más tiempo en crecimiento hasta que se llegó a un OD 600nm de 1.4 antes de precipitar las proteínas. Se realizó una SDS-PAGE al 12.5%, cuyo resultado se observa en la Fig. 5.

Sin importar la presencia de Mg²⁺, la suplementación de EGTA permitió observar mayor número de bandas a las tres presentes en la Fig. 3. No obstante, la nitidez de las mismas fue mejor en aquellos donde estuvo presente el MgCl₂. También se notó que a una menor concentración de EGTA, la intensidad de las bandas fue mayor; de manera similar al comportamiento que se obtuvo con el OD 600nm, lo cual fue más notorio cuando había Mg²⁺.

Para no alejarse de las 5 horas antes determinadas, se decidió que las condiciones de inducción de las proteínas buscadas fuera el crecimiento en caldo LB con EGTA 2.5mM y MgCl₂ 10mM.

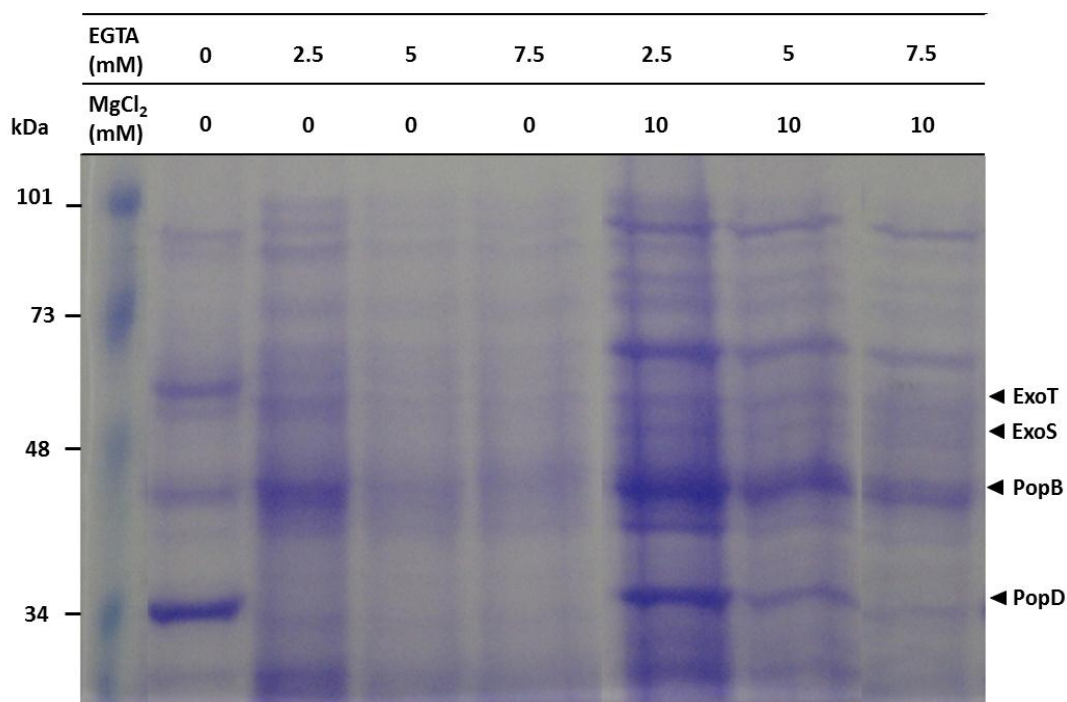


Figura 5. Estandarización de la inducción del T3SS de *P. aeruginosa* PAO1. SDS-PAGE al 12.5% de las proteínas extraídas a partir de un cultivo de 5h de la cepa en caldo LB solo o suplementado con EGTA 2.5, 5 o 7.5 mM; en presencia o ausencia de MgCl₂ 10mM. El gel fue teñido con azul de Coomassie. Las condiciones de cada carril están indicadas en la parte superior. Las flechas indican las posiciones aproximadas de las proteínas señaladas.

IV.5 Estandarización del Western blot

En un primer paso, se determinó las concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios que permitan observar adecuadamente las bandas en la membrana. Para esto, se indujo el T3SS y se precipitaron las proteínas según lo descrito anteriormente y luego se procedió a realizar el Western blot según el Protocolo 1 (Tabla 3). Las concentraciones usadas de anticuerpos primarios y secundarios variaron de 1/5000 a 1/100 para la mezcla de

anticuerpos policlonales contra el T3SS de *P. aeruginosa*, 1/400 a 1/10 para el “pool” de calostro, 1/5000 a 1/200 para el anti-IgG de conejo y 1/500 a 1/200 para el anti-IgG de conejo y el anti-IgA humano. Los resultados de los Western blot se resumen en la Fig. 6.

Respecto a los anticuerpos policlonales, se observaron 3 bandas intensas desde las diluciones 1/250 – 1/250, las cuales corresponden a las proteínas ExoS, PopB y PopD. La banda que corresponde a ExoT fue tenue en todas las concentraciones. Por otro lado, se notaron bandas tenues al usar el “pool” de calostro desde las diluciones 1/100 – 1/500, pero solo se pueden diferenciar fácilmente en las diluciones 1/10 – 1/200.

Por lo anterior, se eligieron las diluciones de 1/100, 1/10, 1/200 y 1/200 para la mezcla de anticuerpos policlonales, el “pool de calostros”, el anti-IgG de conejo y el anti-IgA humano, respectivamente.

Debido a que se tuvieron problemas para detectar las bandas de todas las proteínas en la mezcla de anticuerpos policlonales y la falta de reproducibilidad entre membranas (Datos no mostrados), se decidió probar con el Protocolo 2, en base de lo indicado por Hauser y colaboradores, quienes donaron los anticuerpos (Tabla 3).

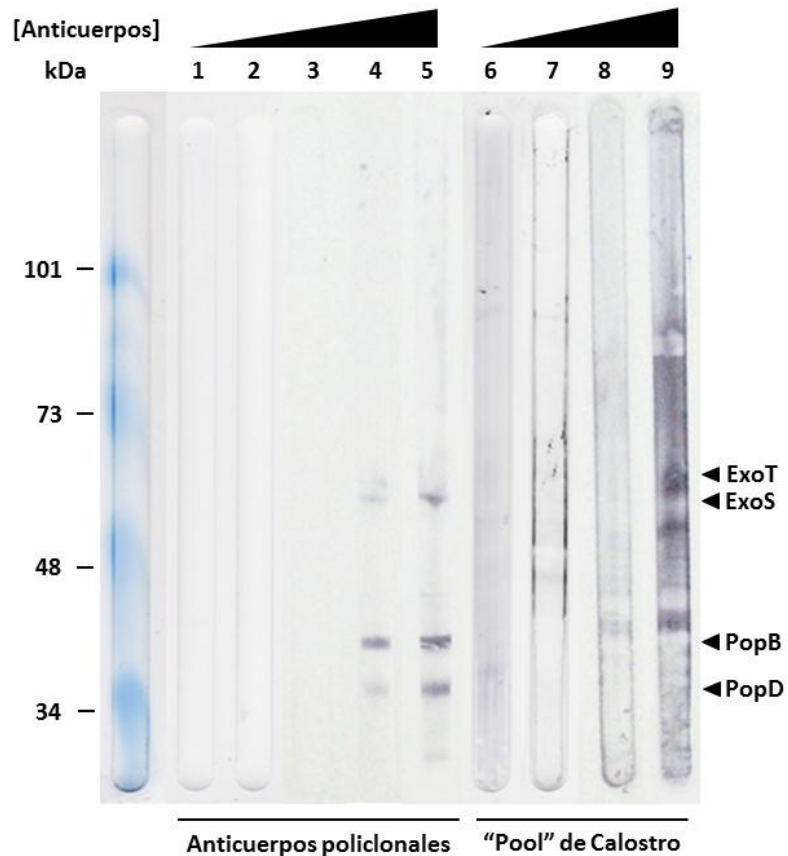


Figura 6. Estandarización de la concentración de anticuerpos. Western blot de las proteínas precipitadas de *P. aeruginosa* PAO1, según lo descrito anteriormente; enfrentadas a una mezcla de anticuerpos policlonales y anti-IgG o a un “pool” de calostro y anti-IgA . La detección colorimétrica se realizó mediante la reacción con 4-cloro naftol. Las concentraciones de los anticuerpos primarios y secundarios fueron: 1, 1/5000 y 1/5000; 2, 1/1000 y 1/1000; 3, 1/500 y 1/500; 4, 1/250 y 1/250; 5, 1/100 y 1/200; 6, 1/400 y 1/500; 7, 1/100 y 1/500; 8, 1/50 y 1/250; 9, 1/10 y 1/200. Las flechas indican las posiciones aproximadas de las proteínas señaladas.

Al cambiar las soluciones y los tiempos de incubación, no hubo problemas en detectar las bandas, tanto en la mezcla de anticuerpos policlonales como en el “pool” de calostro (Fig. 7). No obstante, se notaron bandas inespecíficas en la mezcla de anticuerpos y la nitidez de las bandas no fue óptima debido a los remanentes de leche descremada que quedaron en la membrana. Para solucionar esto, se decidió cambiar los lavados con el buffer fosfato salino (PBS) sin la suplementación de la leche descremada (Protocolo 3, Tabla 3). Al realizar este

cambio, no hubo problemas con la detección de las bandas (Fig. 7), tanto para la mezcla de anticuerpos como para el “pool” de calostro, aunque persistió la presencia de bandas inespecíficas en los anticuerpos policlonales.

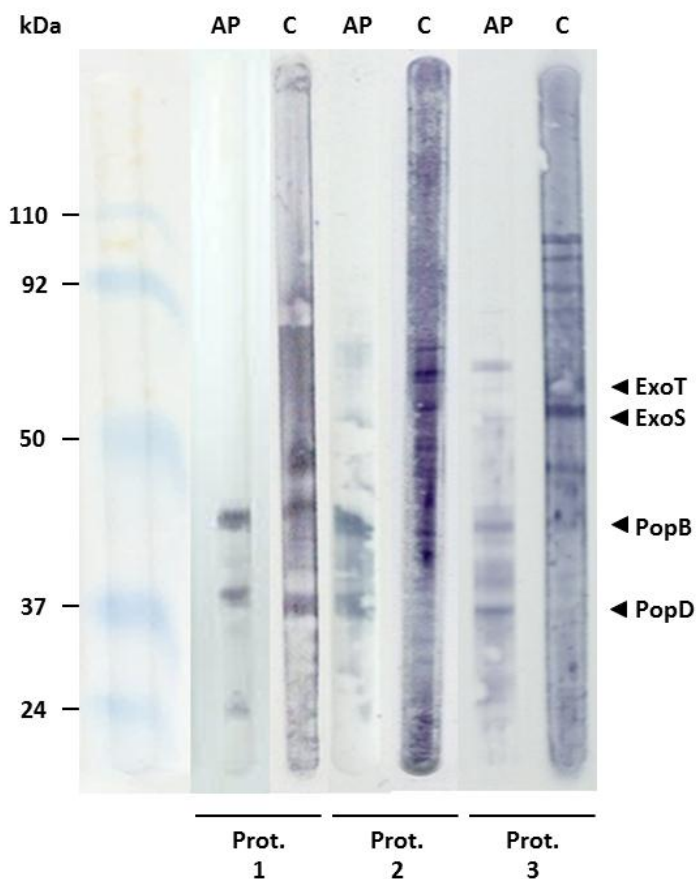


Figura 7. Estandarización del protocolo de Western blot. Las proteínas precipitadas de *P. aeruginosa* PAO1 fueron sometidas a un Western blot usando las soluciones y tiempos de los 3 protocolos descritos en la Tabla 3.. Se usaron como anticuerpos primarios una mezcla de anticuerpos policlonales (AP) o un “pool” de calostro (C). La detección colorimétrica se realizó mediante la reacción con 4-cloro naftol. Las flechas indican las posiciones aproximadas de las proteínas señaladas.

Debido a lo descrito, se optó por elegir el Protocolo 3 para desarrollar los posteriores Western blot. No obstante, se notó que la intensidad de las bandas con la coloración del 4-

cloro naftol no era la óptima. Por tal motivo, se probó la tinción con diaminobencidina. La comparación entre métodos se observa en la Fig 8.

La intensidad de las bandas al revelar con la diaminobencidina fue mayor respecto al 4-cloro naftol cuando se usó la mezcla de anticuerpos, el “pool” calostro o muestras de calostro individuales. Esta mayor intensidad también se observó en las bandas inespecíficas en los anticuerpos policlonales. Además, la intensidad de las bandas reveladas con la diaminobencidina persistió más tiempo que el 4-cloro naftol (Datos no mostrados).

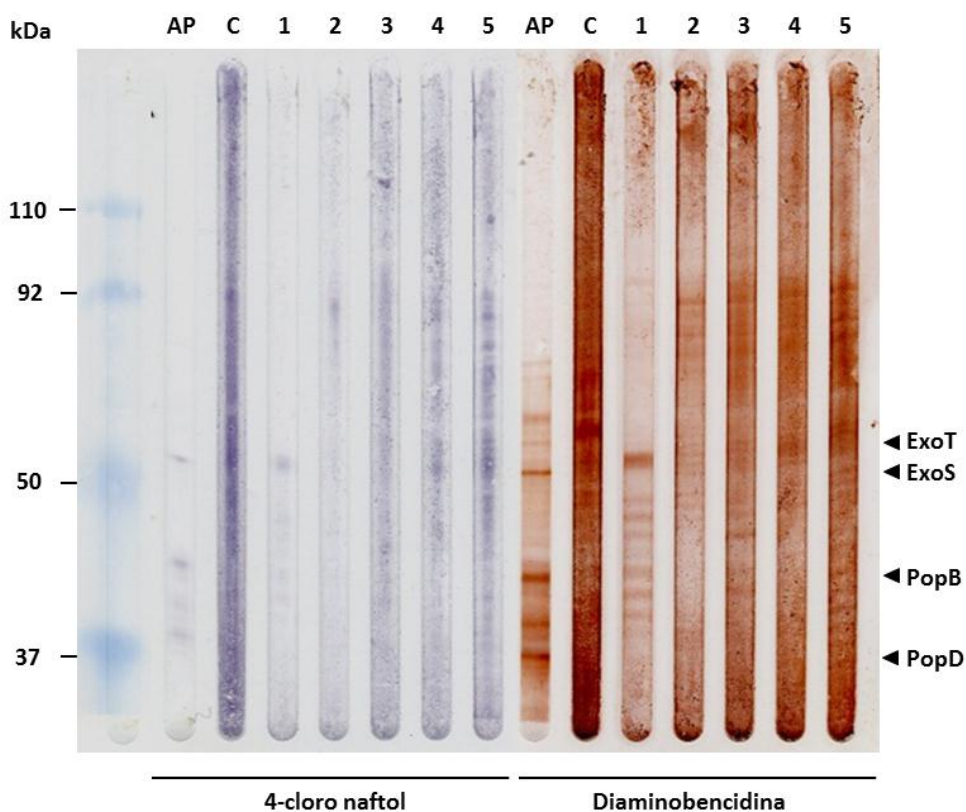


Figura 8. Elección del método de detección colorimétrica. Western blot de las proteínas precipitadas de *P. aeruginosa* PAO1. Se usaron como anticuerpos primarios una mezcla de anticuerpos policlonales (AP), un “pool” de calostro (C) y cinco muestras individuales (1 a 5). La detección colorimétrica se realizó mediante la reacción con 4-cloro naftol o diaminobencidina. No se varió la concentración de los anticuerpos entre ambos métodos de revelado. Las flechas indican las posiciones aproximadas de las proteínas señaladas.

Finalmente por los motivos expuestos, se decidió que las condiciones del Western blot para el análisis de muestras fueran el Protocolo 3, con las diluciones de 1/100, 1/10 y 1/200 para la mezcla de anticuerpos policlonales, las muestras de calostros y los anticuerpos secundarios, respectivamente y el revelado por la reacción de diaminobencidina.

IV.6 Análisis de muestras

Las 150 muestras de calostro fueron sometidas a un Western blot con las condiciones ya mencionadas para determinar la presencia de sIgA contra las proteínas ExoT, ExoS, PopB y PopD. La Fig. 9 muestra un Western blot de 16 muestras de calostro como ejemplo. En la mayoría de casos, además de las bandas correspondientes a los anticuerpos contra el T3SS de *P. aeruginosa* (comparándolo con las bandas de los anticuerpos policlonales), se notaron una gran cantidad de otras bandas cuyo rango de peso molecular varió entre 37 y 92 kDa. Asimismo, la intensidad de las bandas varió entre diferentes muestras.

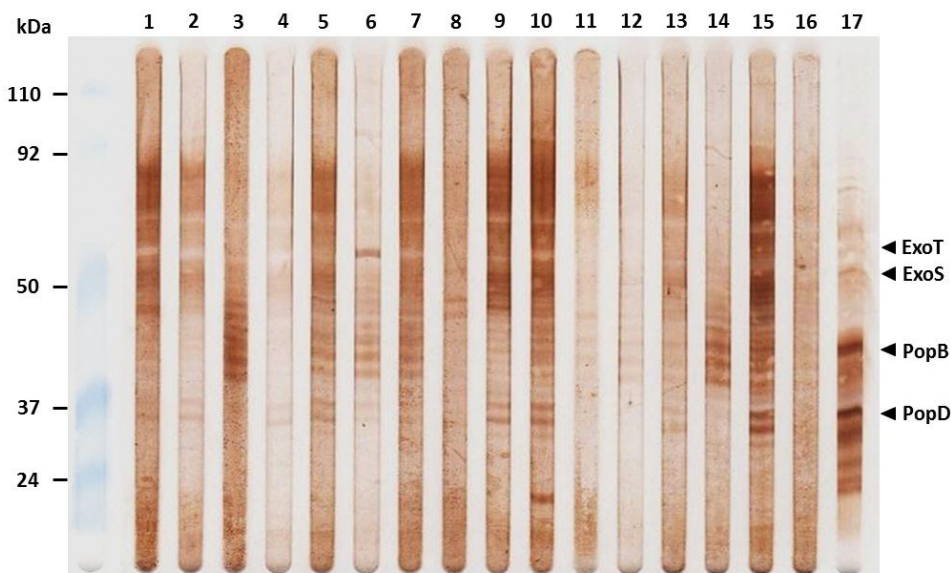


Figura 9. Análisis de muestras. Western blot de 16 muestras individuales de calostro (1 al 16) bajo las condiciones previamente determinadas. Se usó la mezcla de anticuerpos policlonales (17) como control positivo. Las flechas indican las posiciones aproximadas de las proteínas señaladas.

De las 600 observaciones (4 anticuerpos para cada una de las 150 muestras), 377 (62.8 %) tuvieron coincidencia de las 3 personas que evaluaron; mientras que para el resto de las bandas, se decidió la presencia o ausencia con la coincidencia de 2 personas. La frecuencia de los sIgA contra las 4 proteínas estudiadas se muestra en la Tabla 5. En total, la cantidad de muestras que presentaron sIgA contra el T3SS fue alta. En detalle, 97 (64.7%) muestras tuvieron sIgA contra PopD, 103 (68.7%) contra ExoT, 120 (80%) contra ExoS y 120 (80%) contra PopB. Entre las madres con hijos a término (AT), el porcentaje de la presencia fue similar entre los 4 tipos de sIgA (72.0 – 77.3%); mientras que en la población con hijo pretérmino (PT), los porcentajes variaron de 54.7% para PopD hasta 88.0% para ExoS. Al comparar las dos poblaciones (AT vs PT), solo hubo diferencia significativa en la frecuencia de sIgA contra ExoS ($p= 0.014$, 72.0 vs 88.0%) y contra PopD ($p = 0.010$, 74.7 vs 54.7%).

Tabla 5. Frecuencia de sIgA contra el T3SS de *P. aeruginosa* en muestras de calostro.

Proteína	A término¹ (AT, n = 75)	Pretérmino¹ (PT, n = 75)	Total¹ (N = 150)	Valor de p (AT vs. PT)
ExoT	55 (73.3 %, 61.8 – 82.9)	48 (64.0 %, 52.1 – 74.8)	103 (68.7 %, 60.6 – 76.0)	0.218
ExoS	54 (72.0 %, 60.4 – 81.8)	66 (88.0 %, 78.4 – 94.4)	120 (80.0 %, 72.7 – 86.1)	0.014
PopB	58 (77.3 %, 66.2 – 86.2)	62 (82.7 %, 72.2 – 90.4)	120 (80.0 %, 72.7 – 86.1)	0.414
PopD	56 (74.7 %, 62.3 – 84.0)	41 (54.7 %, 42.7 – 66.2)	97 (64.7 %, 56.5 – 72.3)	0.01

¹ Cantidad (Porcentaje, Intervalo de confianza al 95%).

Al determinar los perfiles de presencia de los 4 tipos de sIgA estudiados (Tabla 6), se notó que la presencia simultánea de los cuatro anticuerpos fue la más común (64/150, 42.7%),

seguida por la presencia de ExoT, ExoS y PopB (20/150, 13.3%). La presencia de cualesquiera 3 anticuerpos también fue común (44/150, 29.3%). Solo 8 muestras (5.3%) no presentaron ningún anticuerpo estudiado, pero 3 presentaron al menos una banda de otros pesos moleculares (Datos no mostrados).

Tabla 6. Perfil de anticuerpos contra el T3SS de *P. aeruginosa* en las muestras de calostro. La presencia (+) o ausencia (-) de los 4 anticuerpos fue determinada en cada muestra para generar el respectivo perfil.

Perfil de anticuerpos				A término ¹	Pretérmino ¹	Total ¹
ExoT	ExoS	PopB	PopD	(AT, n = 75)	(PT, n = 75)	(N = 150)
+	+	+	+	37 (49.3 %)	27 (36.0 %)	64 (42.7 %)
+	+	+	-	4 (5.3 %)	16 (21.3 %)	20 (13.3 %)
-	+	+	+	4 (5.3 %)	8 (10.7 %)	12 (8.0 %)
-	+	+	-	2 (2.7 %)	8 (10.7 %)	10 (6.7 %)
-	-	-	-	5 (6.7 %)	3 (4.0 %)	8 (5.3 %)
+	-	+	+	5 (6.7 %)	2 (2.7 %)	7 (4.7 %)
Otros perfiles				18 (24.0 %)	11 (14.7 %)	29 (19.3 %)

¹ Cantidad (Porcentaje).

Como una medida semicuantitativa de la cantidad de anticuerpos, se midió la intensidad de las respectivas bandas en las membranas mediante el programa Image Lab Software 3.0 (Bio-Rad), y los resultados se muestran en la Tabla 7. Se observó un gran rango de intensidades en todos los anticuerpos. Al comparar los valores de intensidad entre las madres con hijos AT y PT, se notó una diferencia significativa en la intensidad de las bandas que corresponden al anticuerpo contra ExoT ($p < 0.001$, 21360 vs. 38674) y contra ExoS ($p < 0.001$, 22949 vs 38667.5).

Tabla 7. Intensidad de bandas que corresponden a los anticuerpos contra el T3SS de *P. aeruginosa*. Los valores de intensidad están dados en unidades arbitrarias.

Proteína	A término (AT)¹	Pretérmino (PT)¹	Total¹	Valor de p (AT vs. PT)
ExoT	21360 ¹ (1360 - 62641)	38674 (4230 - 87978)	27585 (1360 - 87978)	< 0.001
ExoS	22949 (3440 - 119521)	38667.5 (8772 - 114513)	30335.5 (3440 - 119521)	< 0.001
PopB	27009 (1935 - 149836)	28353.5 (7130 - 196768)	28208 (1935 - 196768)	0.539
PopD	31830 (1911 - 172627)	31234 (13416 - 596948)	31410 (1911 - 596948)	0.420

¹ Mediana (Mínimo – Máximo).

Finalmente, como un análisis exploratorio en búsqueda de asociación entre la presencia de los anticuerpos y características maternas, se realizó una regresión logística múltiple y los valores de *odds ratio* (OR) y sus intervalos de confianza al 95% se presentan en la Tabla 8.

Ninguna característica pudo explicar la presencia de los 4 anticuerpos a la misma vez. El tiempo de toma de muestra fue un “factor protector” (OR significativo y menor a 1) para la presencia de sIgA contra ExoT (0.66), ExoS (0.58) y PopB (0.53). Por otro lado, la edad materna fue un “factor de riesgo” (OR significativo y mayor a 1) para la presencia de anticuerpos contra PopB (1.15) y PopD (1.09), mientras que el número de embarazos lo fue solo para la presencia de sIgA de PopD (2.05). La edad gestacional fue un “factor protector” para la presencia de sIgA contra ExoS (0.71), pero un “factor de riesgo” para el anticuerpo contra PopD (1.17). Finalmente, el número de paridad no estuvo asociado a la presencia de ningún anticuerpo.

Tabla 8. Odds ratio e intervalos de confianza al 95% de la presencia de los sIgA contra el T3SS de *P. aeruginosa* según las características maternas.

Característica materna	Proteína			
	ExoT	ExoS	PopB	PopD
Edad materna	1.04 (0.96 - 1.11)	1.02 (0.93 - 1.12)	1.15 (1.04 - 1.28)	1.09 (1.01 - 1.18)
Número de embarazos	1.32 (0.72 - 2.42)	1.14 (0.52 - 2.51)	1.65 (0.67 - 4.03)	2.05 (1.04 - 4.04)
Edad gestacional	0.96 (0.85 - 1.09)	0.71 (0.58 - 0.86)	0.89 (0.75 - 1.05)	1.17 (1.03 - 1.33)
Tiempo de la muestra	0.66 (0.49 - 0.90)	0.58 (0.39 - 0.86)	0.53 (0.36 - 0.78)	0.78 (0.59 - 1.04)
Número de paridad	0.63 (0.29 - 1.40)	0.69 (0.26 - 1.87)	0.36 (0.11 - 1.10)	0.38 (0.16 - 0.91)

V. Discusión

La presencia de anticuerpos en calostro es importante para el recién nacido, puesto que su sistema inmune aún no ha madurado (Brandtzaeg, 2010). En este trabajo, se determinó la presencia de inmunoglobulina A secretora (sIgA) contra algunas proteínas del T3SS de *Pseudomonas aeruginosa* (ExoT, ExoS, PopB, PopD) en el calostro de mujeres peruanas. Esto se determinó basado en la presencia de bandas con peso molecular similar a las proteínas buscadas y que recorrían la misma distancia que la respectiva banda al usar la mezcla de anticuerpo policlonales (Fig. 9).

Los blancos contra los que actúan los anticuerpos presentes en la leche materna reflejan la exposición de la madre frente a diversos antígenos (Brandtzaeg, 2010; Breakley et al., 2015). Por tanto, la presencia de anticuerpos contra *P. aeruginosa* en calostro demuestra que dichas madres han estado en contacto con este patógeno. Las fuentes de contaminación podrían ser reservorios de agua, aire, ambientes intrahospitalarios, entre otros; lo cual puede facilitar la colonización de las vías respiratorias o el intestino (De Bentzmann y Plésiat, 2011). Al contacto con estos tejidos, el T3SS es inducido y las proteínas translocadoras y efectoras son secretadas (Diaz et al., 2011). El sistema inmune del hospedero puede generar células B capaces de producir anticuerpos contra estas proteínas (Cruz et al., 2012). Finalmente, las células B llegan al tejido mamario, en donde los anticuerpos son incorporados a la leche materna (Brandtzaeg, 2010; Corthesy, 2013).

La generación de anticuerpos contra el T3SS de *P. aeruginosa* por parte del hospedero está comprobada en estudios previos. Diversos trabajos han encontrado IgG contra ExoT, ExoS, PopB, PopD y otras proteínas relacionadas en el suero sanguíneo de adultos y niños con CF (Moss et al., 2001; Banwart et al., 2002; Corech et al., 2005; Cruz et al., 2012). La frecuencia de estos anticuerpos varía según la proteína contra la que actúa: contra ExoT (75 – 82%), ExoS (33 – 91%), PopB (54 – 100%) y PopD (73 – 91%). Además, también se ha comprobado la existencia de este tipo de IgG en suero de personas sanas, aunque en un menor porcentaje respecto a los pacientes con CF (Cruz et al., 2012).

Por otro lado, la capacidad de la expresión del T3SS en cepas de *P. aeruginosa* ha sido estudiada, mediante Western blot o ELISA, dando un amplio rango de porcentajes. Por

ejemplo, en cepas aisladas de neumonía, la producción de ExoS fue aproximadamente de 45%, mientras que un 23% no producía ninguna proteína del T3SS (Hauser et al., 2002; El-Sohl et al., 2008). En tanto, la producción de ExoT y ExoS fue de 95 y 27%, respectivamente, en cepas que causaron bacteremia (El-Sohl et al., 2012); mientras que en aquellas que generaron infecciones nosocomiales, fue de 63 y 37%, respectivamente (Hattemer et al., 2013). Asimismo, la expresión en cepas aisladas del ambiente (suelos, agua o alimentos) fue de 72% para ExoS, 100% para ExoT, 78% para PopB y 83% para PopD (Jain et al., 2004). Finalmente, otro estudio analizó cepas clínicas aisladas de diferentes lugares (sangre, orina, esputo, entre otros), encontraron que estas expresaban ExoT, ExoS, PopB y PopD en un 84, 62, 85 y 85%, respectivamente (Li et al., 2005). Las frecuencias de sIgA contra las proteínas mencionadas encontradas en este trabajo (65 – 80%) está dentro de lo esperado, puesto que son comparables a los porcentajes mencionados tanto para la presencia de IgG en suero, como para la expresión en cepas de *P. aeruginosa*. No obstante, hay que recalcar que estas frecuencias reflejan lo que sucede en la población peruana, mientras que lo mencionado corresponden a poblaciones de otros países. Debido a la cantidad de estudios y a que la expresión de los genes está modulada por factores ambientales que no son constantes (El-Sohl et al., 2012), no se puede dilucidar un porcentaje de prevalencia global para comparar mejor las frecuencias encontradas en este trabajo.

Se ha podido encontrar también la existencia de anticuerpos en calostro contra otros antígenos de *P. aeruginosa*, lo cual se ve reflejado en la gran cantidad de bandas que reaccionaron en las muestras individuales de calostro (Fig. 9). Anteriormente se ha reportado, en suero sanguíneo, la presencia de anticuerpos contra diversos antígenos de esta bacteria, tales como su lipopolisacárido, la exotoxina A, el alginato, la elastasa, entre otros (Moya et al., 2007; Dođru et al., 2013). Asimismo, otras proteínas del T3SS, como PcrV, también producen anticuerpos en el hospedero (Cruz et al., 2012). Los demás sistemas de secreción producen proteínas, como la proteasa alcalina, lipasas, fosfatasas, hemolisinas y otras toxinas, que también pueden generar respuesta inmune y que pueden estar entre las proteínas precipitadas (Gellaly y Hancock 2013; Filloux, 2011). Todo esto puede explicar la presencia de anticuerpos contra la diversidad de antígenos de *P. aeruginosa*, obtenidas para una gran cantidad de muestras analizadas. A nuestro conocimiento, debido a que

anteriormente solo se ha reportado la presencia de sIgA contra el LPS de esta bacteria (Tabla 2); este es el primer trabajo en reportar sIgA contra proteínas secretadas de *P. aeruginosa*, específicamente de su sistema de secreción tipo III, en calostro humano. Por este motivo, no es posible hacer una comparación directa entre frecuencias de este tipo de sIgA en distintas poblaciones.

Respecto al proceso de estandarización, hay similitudes y diferencias con lo reportado en la literatura. El tiempo de duplicación aquí reportado para *P. aeruginosa* PAO1 en caldo LB (20 min) es similar a lo encontrado por Mandsgerg et al. (2009) y LaBauve y Wargo (2012): 26 y 25-35 min, respectivamente. En cuanto a la cantidad de volumen de sobrenadante para precipitar las proteínas, el rango utilizado en diferentes estudios va de 1.5 a 5 ml (Hauser et al., 2002; Kholer et al., 2013; Hattermer et al., 2013), dentro del cual se encuentra lo aquí determinado (2.5ml, Fig. 3). Es importante determinar la cantidad de proteína a usar, puesto que volúmenes pequeños representan una cantidad de proteínas baja, lo cual no podría llegar a ser detectado por la sensibilidad del azul de Coomassie, la cual es baja en comparación a la tinción de plata (Chevallet et al., 2006). Por otro lado, una gran cantidad de sobrenadante, si bien incrementa la cantidad de proteínas, podría generar bandas tan intensas y gruesas que pueden ocultar a bandas de proteínas cuya expresión haya sido menor u ocultar bandas de peso molecular cercano (Gilda et al., 2015), como es el caso de las proteínas ExoS y ExoT.

El efecto del EGTA y el Mg^{2+} en la expresión del T3SS de *P. aeruginosa* también ha sido reportado. Se ha demostrado que la presencia de este quelante induce la secreción, pero no la expresión; es decir, las proteínas esperadas se encuentran en el citoplasma y al añadir el compuesto, son secretadas al medio extracelular y se pueden extraer del sobrenadante (Kim et al., 2005). Asimismo, el EGTA es conocido por quelar Ca^{2+} , pero también tiene la capacidad de hacerlo con otros cationes divalentes, entre ellos el Mg^{2+} , aunque con menos afinidad que con el Ca^{2+} (Sorour et al., 2015). Al disminuir la cantidad de magnesio disponible, se afecta el crecimiento de la bacteria, puesto que este ion es cofactor de diversas reacciones, como la replicación del ADN (Nelson y Cox, 2009). Esto explicaría por qué a mayores concentraciones de EGTA, el tiempo para llegar al OD esperado es alto, la intensidad de las bandas es baja y hay una menor coloración verdosa (Fig. 4 y 5). Además, también explica porque al añadir el $MgCl_2$, se restaura el crecimiento y el tiempo que tarda

en llegar al OD es igual al tratamiento sin EGTA ni Mg^{2+} (Fig. 4 y 5). Esta relación entre la secreción de proteínas del T3SS y la cantidad de Ca^{2+} y Mg^{2+} ha sido reportada antes; no usando EGTA, sino elaborando medios de crecimiento con diferentes concentraciones de los cationes mencionados (Horsman et al., 2012).

No obstante, resulta interesante que la mayoría de protocolos para obtener el T3SS no usen la suplementación de Mg^{2+} . El método de inducción más utilizado es el crecimiento de la cepa por una noche en caldo LB con EGTA 5mM (Rolsma y Frank, 2014), lo cual podría asegurar no solo que se llegue a un OD óptimo, sino que la cantidad de proteína obtenida sea la adecuada. Sin embargo, dependiendo de la cepa, la expresión de proteasas puede degradar las proteínas secretadas. Por tanto, un menor tiempo de inducción es útil para las cepas que producen proteasas como la elastasa y la proteasa alcalina, como es el caso de la cepa PAO1 (Rolsma y Frank, 2014). De esta manera, con el objetivo de reducir el tiempo de trabajo, las condiciones obtenidas en este trabajo (EGTA 2.5mM y $MgCl_2$ 10mM) son adecuadas.

Respecto a las condiciones del Western blot, hay algunas discordancias respecto a lo reportado. La concentración aquí usada del “pool” de anticuerpos policlonales es mayor a lo que utilizan y recomiendan los autores originales: dilución 1/100 vs 1/1000 (Hauser et al., 2002; Hattermer et al., 2013). Esto podría explicarse por la cantidad de proteínas usadas en cada trabajo, así como en la concentración del anticuerpo donado. Por otro lado, las concentraciones usadas para las muestras de calostro sí están conformes a lo utilizado anteriormente para este tipo de estudios (Noguera-Obenza et al., 2003; Durand et al., 2013). Estos bajos factores de dilución (1/10 – 1/40) podrían explicarse por la cantidad de anticuerpos sIgA que se encuentran en calostro: entre 2 – 3 mg/ml para sIgA total (Araújo et al., 2005; Kawano y Emori, 2013); por lo que la cantidad de sIgA contra una proteína específica sería más baja y por tanto, una mayor dilución no permitiría detectar los anticuerpos. Por otro lado, se recomienda realizar las pruebas con diferentes soluciones buffer (usualmente PBS o TBS), debido a los diferentes resultados que se obtienen al usar distintos anticuerpos (Gilda et al., 2015). En este caso, los anticuerpos policlonales mostraron mejores resultados con el protocolo con PBS y una mayor concentración de leche descremada, lo cual puede mejorar el bloqueo de las proteínas y por tanto, el resultado final. En cambio, los anticuerpos del calostro muestran una versatilidad respecto a la solución de

trabajo, puesto que anteriormente se trabajaron las muestras con TBS (Durand et al., 2013) y en esta investigación, con PBS. La diferencia de resultados entre los distintos anticuerpos hace notar la importancia del proceso de estandarización del Western Blot (Gilda et al., 2015). Finalmente, anteriormente ya se había reportado que el revelado con diaminobencidina es más sensible que con 4-cloro naftol (Davies et al., 1994), lo cual concuerda con este trabajo. No obstante, a diferencia de ese estudio, la intensidad de bandas duró más tiempo con la diaminobencidina que con el 4-cloro naftol. Diferentes formas de almacenar las membranas, así como el tiempo de espera pueden explicar la diferencia entre los resultados.

En este trabajo se realizó una semicuantificación de los anticuerpos encontrados. Para dos proteínas (ExoT y ExoS), se encontró que la intensidad de las bandas fue mayor en las muestras provenientes de madres con hijos pretérmino respecto a aquellos con hijos a término (Tabla 7). Este resultado es concordante con los reportes que señalan que en calostro, los niveles de proteínas, entre ellas los sIgA totales son mayores en partos prematuros respecto a partos a término (Araújo et al., 2005; Ballard y Morrow, 2013). Asimismo, se realizó un análisis exploratorio sobre la asociación de características maternas con la presencia de los anticuerpos buscados. La composición de la leche materna, incluyendo los niveles de sIgA, está determinado por diversos factores, como la edad gestacional, el índice de masa corporal materno, el estado de lactancia, el número de paridad, factores genéticos, entre otros (Turin y Ochoa, 2014; Hsu et al., 2014). Los resultados con significancia estadísticas de la Tabla 8 no deben ser tomados como determinantes, puesto que no se ha tenido en cuenta el tamaño muestral necesario para realizar conclusiones. No obstante, resulta interesante que hubo cierto grado de coincidencia con lo reportado en la literatura. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos contra ExoT, ExoS y PopB fue menor mientras mayor tiempo pasó para la toma de muestra, lo cual concuerda con el hecho que los niveles de sIgA disminuyen en el tiempo (Hsu et al., 2014). Además, se ha reportado que la cantidad de sIgA en leche materna tuvo una tendencia a subir con la edad materna, sin presentar diferencia significativa; mientras que no se mostraron tendencias con el número de paridad o el número de embarazos (Bachour et al., 2012), de manera similar a lo expuesto en la Tabla 8.

Los beneficios de los sIgA presentes en leche materna para el recién nacido son conocidos. Por ejemplo, el aumento de la cantidad de sIgA en el calostro se asocia a una menor tasa de síntomas (gastrointestinales o respiratorias) en el niño (Breakley et al., 2015). Específicamente contra *P. aeruginosa*, se ha reportado que *in vitro*, sIgA contra LPS de *P. aeruginosa*, con o sin lactoferrina, tienen un efecto bacteriostático (Funakoshi et al., 1981) y que sIgA de calostro inhibe la adherencia de esta bacteria a epitelio de córnea (Masinick et al., 1997). Bloquear las proteínas del T3SS es clave para combatir infecciones agudas respiratorias y disminuir la mortalidad de *P. aeruginosa* (Sawa et al., 2014), por lo que la presencia de sIgA contra su T3SS en calostro sería favorable para el recién nacido. Por ejemplo, se sabe que la bacteria coloniza el tracto intestinal y es capaz de traspasarlo, causando infecciones sistémicas. Incluso, algunas infecciones en pulmón pueden deberse a la diseminación de la bacteria por la sangre. Por esto, la sepsis por *P. aeruginosa* puede estar asociada a su presencia en el intestino. Este proceso es más prevalente en personas inmunosuprimidas u hospitalizadas, como los recién nacidos (Markou y Apidianakis, 2013). Durante el proceso de invasión, la proteína ExoS se localiza en la membrana de la célula hospedera para unirse con el factor FXD3, inhibiendo su actividad Na^+/K^+ ATPasa y por tanto, disminuyendo la expresión de proteínas, como ocludina y ZO-1, en las uniones estrechas, lo cual ocasiona su ruptura. Esto facilita el paso de la bacteria a través del tejido epitelial (Okuda et al., 2010). De esta manera, anticuerpos contra ExoS podrían prevenir este proceso y por tanto, evitar casos de sepsis neonatal. Incluso, anticuerpos contra ExoT podrían también funcionar, debido a que estas dos proteínas son homólogas (75% de identidad) y puede llegar a haber una reacción cruzada (Hauser et al., 2002; Hauser, 2009). Incluso, la cantidad de sIgA contra ExoS fue mayor en madres con hijos pretérmino respecto a aquellas con hijos a término (Tabla 7). Esto trae en consideración el potencial rol protector de estos anticuerpos ante una infección sistémica causada por *P. aeruginosa* en esos recién nacidos.

Sin embargo, neutralizar las proteínas efectoras con anticuerpos específicos podría ser no efectivo. Por tanto, es más recomendable atacar los sistemas de secreción o translocación, como las proteínas PopB y PopD, para disminuir la virulencia. (Sawa et al., 2014). De esta manera, anteriormente se ha probado *in vitro* que el uso de anticuerpos contra PcrV

disminuye la translocación de ExoY. No obstante, este efecto no ocurrió al usar anticuerpos contra ExoU, ExoY o PopD (Sawa et al., 1999). Por otro lado, la inmunización pasiva con anticuerpos anti-PcrV protegió a todos los ratones infectados con *P. aeruginosa*. En cambio, al usar anticuerpos anti-ExoU o anti-PopD, la supervivencia fue parcial o nula. Además, al enfrentar la bacteria con los anticuerpos antes de la infección al ratón, solo aquellos contra PcrV protegieron de la infección (Sawa et al., 1999). Asimismo, se ha reportado que anticuerpos contra PcrV inhibieron la hemólisis de eritrocitos por *P. aeruginosa* de una forma dosis dependiente, lo cual no pasó con los anticuerpos contra PopB y PopD (Goure et al., 2005). Debido a estos resultados, se ha ido usando anticuerpos contra PcrV como tratamiento e incluso vacuna contra *P. aeruginosa* (Sawa et al., 2014). En cambio, los anticuerpos contra otras proteínas del T3SS han sido usados como herramienta de diagnóstico de la infección por esta bacteria en pacientes con fibrosis quística, no encontrándose aún un rol protector (Mauch y Levy, 2014). No obstante, debido a que el 85% de los géneros presentes en la microbiota de los ratones no están en aquella de los humanos (Nguyen et al., 2015) y a que esta participa en el desarrollo del sistema inmune, por ejemplo, de las células presentadoras de antígenos y las células Tc (Wu y Wu, 2012), es posible que resultados distintos puedan obtenerse. Por tanto, determinar la actividad funcional de estos anticuerpos es importante para asegurar que estos pueden prevenir enfermedades contra *P. aeruginosa*. El ensayo de la capacidad bactericida del anticuerpo (SBA, del inglés “Serum Bactericidal Antibody Assay”) es adecuado para esta bacteria (Feavers y Walker, 2010).

Este trabajo tiene algunas limitaciones. En primer lugar, no se ha probado otros quelantes de calcio, como el ácido nitrilotriacético (Rietsch y Mekalanos, 2006); ni se ha probado con otros métodos de extracción de proteínas, como la precipitación con sulfato de amonio (Howell et al., 2013) para obtener las proteínas del T3SS. En segundo lugar, tampoco se ha hecho una cuantificación de las proteínas obtenidas y solo se basó en la intensidad de las bandas, tanto para las proteínas del T3SS como para los anticuerpos. Esto es debido a que no se extrajo las proteínas específicas, sino todas las presentes, sea en el sobrenadante del cultivo celular o en el suero de calostro. Dicha cuantificación puede realizar mejor con métodos como el ELISA (Li et al 2005) o el Western blot cuantitativo (Taylor y Posch, 2014). Sin embargo, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia o ausencia de los

anticuerpos, para lo cual, el método de Western Blot es suficiente. Asimismo, no se determinó la presencia de sIgA contra todas las proteínas del T3SS, tales como ExoU, debido a que la cepa PAO1 no la expresa; o PcrV, porque no se contaba con anticuerpos contra esta proteína como control positivo. Debido a que es poco común encontrar la expresión simultánea de ExoS y ExoU (Feltman et al., 2001), sería necesario el uso de varias cepas, como PA103 y PAK, para poder detectar anticuerpos contra todas las proteínas del T3SS; o el uso de proteínas recombinantes para aquellas que no han sido analizadas. Finalmente, no se ha utilizado un control negativo, el cual pudo ser una cepa que no exprese el T3SS debido al bloqueo de los genes (*gene knockout*) de cada proteína o del activador transcripcional ExsA.

VI. Conclusiones

En este trabajo se determinó una alta prevalencia ($> 60\%$) de inmunoglobulina A secretora contra las proteínas ExoS, ExoT, PopB y PopD, pertenecientes al sistema de secreción tipo III de *Pseudomonas aeruginosa*, en calostro de mujeres peruanas; lo que refleja la exposición previa de la madre ante este patógeno. El perfil de anticuerpos más común fue la presencia simultánea de los cuatro anticuerpos ($\approx 40\%$). Además, se determinaron condiciones nuevas para la inducción, extracción de las proteínas mencionadas y la detección de anticuerpos contra estas en calostro humano.

VII. Recomendaciones

Las recomendaciones para el estudio se basan en las limitaciones antes descritas. En primer lugar, se puede cuantificar y determinar la actividad funcional de los anticuerpos para confirmar si estos pueden proteger a los recién nacidos contra las infecciones causadas por *P. aeruginosa*. En segundo lugar, es deseable detectar la presencia de sIgA contra PcrV, debido al rol protector que cumplen los anticuerpos contra esta proteína. Asimismo, se puede contar con el control negativo para una determinación más adecuada de la presencia de los anticuerpos. Finalmente, se debe incrementar el tamaño muestral de ambos grupos (madres con niños a término y pretérmino) si se desea determinar concluyentemente una relación entre las características de la madre y sus hijos y la presencia de los anticuerpos en el calostro.

VIII. Referencias bibliográficas

1. Aanaes K, Johansen HK, Poulsen SS, Pressler T, Buchwald C, Høiby N. Secretory IgA as a diagnostic tool for *Pseudomonas aeruginosa* respiratory colonization. *J Cyst Fibros*. 2013; 12(1):81-7.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
3. Achí R, Dac Cam P, Forsum U, Karlsson K, Sáenz P, Mata L, Lindberg AA. Titres of class-specific antibodies against *Shigella* and *Salmonella* lipopolysaccharide antigens in colostrum and breast milk of Costa Rican, Swedish and Vietnamese mothers. *J Infect*. 1992; 25(1):89-105.
4. Araújo ED, Carbonare SB, de Araújo MC, Palmeira P, Amaral JA, Sales VS. Total and specific IgA in colostrum and milk of mothers of Natal-Rio Grande do Norte, Brasil. *Acta Cir Bras*. 2005; 20 Suppl 1:178-84.
5. Arnold RR, Mestecky J, McGhee JR. Naturally occurring secretory immunoglobulin A antibodies to *Streptococcus mutans* in human colostrum and saliva. *Infect Immun*. 1976; 14(2):355-62.
6. Bachour P, Yafawi R, Jaber F, Choueiri E, Abdel-Razzak Z. Effects of smoking, mother's age, body mass index, and parity number on lipid, protein, and secretory immunoglobulin A concentrations of human milk. *Breastfeed Med*. 2012; 7(3):179-88.
7. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013; 60(1):49-74.
8. Banwart B, Splaingard ML, Farrell PM, Rock MJ, Havens PL, Moss J, et al. Children with cystic fibrosis produce an immune response against exoenzyme S, a type III cytotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis*. 2002; 185(2):269-70.
9. Beckert U, Wolter S, Hartwig C, Bähre H, Kaever V, Ladant D, et al. ExoY from *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for cGMP and cUMP formation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 450(1):870-4.
10. Berthelot P, Attree I, Plésiat P, Chabert J, de Bentzmann S, Pozzetto B, et al. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of *Pseudomonas*

- aeruginosa* bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and *exo* genes. J Infect Dis. 2003; 188(4):512-8.
11. Bleves S, Soscia C, Nogueira-Orlandi P, Lazdunski A, Filloux A. Quorum sensing negatively controls type III secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol. 2005; 187(11):3898-902.
 12. Bode L. Human milk oligosaccharides: prebiotics and beyond. Nutr Rev. 2009; 67 Suppl 2:S183-91.
 13. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis. 1983; 5(2):279-313.
 14. Brandtzaeg P. The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. J Pediatr. 2010; 156(2 Suppl):S8-15.
 15. Breakey AA, Hinde K, Valeggia CR, Sinofsky A, Ellison PT. Illness in breastfeeding infants relates to concentration of lactoferrin and secretory Immunoglobulin A in mother's milk. Evol Med Public Health. 2015; 2015(1):21-31.
 16. Bucior I, Pielage JF, Engel JN. *Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium. PLoS Pathog. 2012; 8(4):e1002616.
 17. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 1981 Apr;112(2):195-203.
 18. Carbonare CB, Carbonare SB, Carneiro-Sampaio MM. Secretory immunoglobulin A obtained from pooled human colostrum and milk for oral passive immunization. Pediatr Allergy Immunol. 2005; 16(7):574-81.
 19. Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 165(7):867-903.
 20. Chatterjee S, Chaudhury S, McShan AC, Kaur K, De Guzman RN. Structure and biophysics of type III secretion in bacteria. Biochemistry. 2013; 52(15):2508-17.
 21. Chen K, Xu W, Wilson M, He B, Miller NW, Bengtén E, et al. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. Nat Immunol. 2009; 10(8):889-98.

22. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protoc.* 2006; 1(4):1852-8.
23. Cisz M, Lee PC, Rietsch A. ExoS controls the cell contact-mediated switch to effector secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2008; 190(8):2726-38.
24. Cleary TG, West MS, Ruiz-Palacios G, Winsor DK, Calva JJ, Guerrero ML, et al. Human milk secretory immunoglobulin A to *Shigella* virulence plasmid-coded antigens. *J Pediatr.* 1991; 118(1):34-8.
25. Coburn B, Sekirov I, Finlay BB. Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(4):535-49.
26. Corech R, Rao A, Laxova A, Moss J, Rock MJ, Li Z, et al. Early immune response to the components of the type III system of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8):3956-62.
27. Corthésy B. Multi-faceted functions of secretory IgA at mucosal surfaces. *Front Immunol.* 2013; 4:185.
28. Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(6):343-59.
29. Cruz AC, Neves BC, Higa LY, Folescu T, Marques EA, Milagres LG. Type III apparatus of *Pseudomonas aeruginosa* as a tool to diagnose pulmonary infection in cystic fibrosis patients. *APMIS.* 2012; 120(8):622-7.
30. Davies RL, Parton R, Coote JG, Gibbs HA, Freer JH. Evaluation of different methods for the detection of outer membrane proteins and lipopolysaccharides of *Pasteurella haemolytica* by immunoblotting. *J Immunol Methods.* 1994; 167(1-2):35-45.
31. Davis CP, Houston CW, Fader RC, Goldblum RM, Weaver EA, Goldman AS. Immunoglobulin A and secretory immunoglobulin A antibodies to purified type 1 *Klebsiella pneumoniae* pili in human colostrum. *Infect Immun.* 1982; 38(2):496-501.
32. De Bentzmann S, Plésiat P. The *Pseudomonas aeruginosa* opportunistic pathogen and human infections. *Environ Microbiol.* 2011; 13(7):1655-65.
33. Dettman JR, Rodrigue N, Aaron SD, Kassen R. Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(52):21065-70.

34. Diaz MR, King JM, Yahr TL. Intrinsic and Extrinsic Regulation of Type III Secretion Gene Expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2011; 2:89.
35. Doğru D, Pekcan S, Yalçın E, Özçelik U, Kiper N, Gürcan N, et al. The role of serum *Pseudomonas aeruginosa* antibodies in the diagnosis and follow-up of cystic fibrosis. *Turk J Pediatr.* 2013; 55(1):50-7.
36. Durand D, Ochoa TJ, Bellomo SM, Contreras CA, Bustamante VH, Ruiz J, Cleary TG. Detection of secretory immunoglobulin A in human colostrum as mucosal immune response against proteins of the type III secretion system of *Salmonella*, *Shigella* and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Pediatr Infect Dis J.* 2013; 32(10):1122-6.
37. El Solh AA, Akinnusi ME, Wiener-Kronish JP, Lynch SV, Pineda LA, Szarpa K. Persistent infection with *Pseudomonas aeruginosa* in ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 178(5):513-9.
38. El-Solh AA, Hattemer A, Hauser AR, Alhajhusain A, Vora H. Clinical outcomes of type III *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Crit Care Med.* 2012; 40(4):1157-63.
39. Feavers I, Walker B. Functional antibody assays. *Methods Mol Biol.* 2010;626:199-211.
40. Feist N, Berger D, Speer CP. Anti-endotoxin antibodies in human milk: correlation with infection of the newborn. *Acta Paediatr.* 2000; 89(9):1087-92.
41. Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2001; 147(Pt 10):2659-69.
42. Fernandes RM, Carbonare SB, Carneiro-Sampaio MM, Trabulsi LR. Inhibition of enteroaggregative *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by secretory immunoglobulin A from human colostrum. *Pediatr Infect Dis J.* 2001; 20(7):672-8.
43. Field CJ. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *J Nutr.* 2005; 135(1):1-4.
44. Filloux A. Protein Secretion Systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An Essay on Diversity, Evolution, and Function. *Front Microbiol.* 2011; 2:155.
45. Fitzsimmons CM, Falcone FH, Dunne DW. Helminth Allergens, Parasite-Specific IgE, and Its Protective Role in Human Immunity. *Front Immunol.* 2014; 5:61.

46. Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikevich A, Wiehlmann L, Schomburg D. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiol.* 2010; 12(6):1734-47.
47. Funakoshi S, Doi T, Nakajima T, Suyama T, Tokuda M. Antimicrobial effect of human serum IgA. *Microbiol Immunol.* 1982; 26(3):227-39.
48. Galle M, Carpentier I, Beyaert R. Structure and function of the Type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Protein Pept Sci.* 2012; 13(8):831-42.
49. Gavilanes-Parra S, Mendoza-Hernández G, Chávez-Berrocal ME, Girón JA, Orozco-Hoyuela G, Manjarrez-Hernández A. Identification of secretory immunoglobulin A antibody targets from human milk in cultured cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Microb Pathog.* 2013; 64:48-56.
50. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis.* 2013; 67(3):159-73.
51. Gilda JE, Ghosh R, Cheah JX, West TM, Bodine SC, Gomes AV. Western Blotting Inaccuracies with Unverified Antibodies: Need for a Western Blotting Minimal Reporting Standard (WBMRS). *PLoS One.* 2015; 10(8):e0135392.
52. Glass WF 2nd, Briggs RC, Hnilica LS. Identification of tissue-specific nuclear antigens transferred to nitrocellulose from polyacrylamide gels. *Science.* 1981; 211(4477):70-2.
53. Goldová J, Ulrych A, Hercík K, Branny P. A eukaryotic-type signalling system of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to oxidative stress resistance, intracellular survival and virulence. *BMC Genomics.* 2011; 12:437.
54. Goure J, Broz P, Attree O, Cornelis GR, Attree I. Protective anti-V antibodies inhibit *Pseudomonas* and *Yersinia* translocon assembly within host membranes. *J Infect Dis.* 2005; 192(2):218-25.
55. Hancock RE1, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat.* 2000; 3(4):247-255.
56. Hare NJ, Solis N, Harmer C, Marzook NB, Rose B, Harbour C, et al. Proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* AES-1R, PAO1 and PA14 reveals potential virulence determinants associated with a transmissible cystic fibrosis-associated strain. *BMC Microbiol.* 2012; 12:16.

57. Hattemer A, Hauser A, Diaz M, Scheetz M, Shah N, Allen JP, et al. Bacterial and clinical characteristics of health care- and community-acquired bloodstream infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(8):3969-75.
58. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, Mariscal D, Vallés J, Engel JN, et al. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med*. 2002; 30(3):521-8.
59. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*. 2009; 7(9):654-65.
60. Hawkes R, Niday E, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem*. 1982; 119(1):142-7.
61. Hayani KC, Guerrero ML, Morrow AL, Gomez HF, Winsor DK, Ruiz-Palacios GM, et al. Concentration of milk secretory immunoglobulin A against *Shigella* virulence plasmid-associated antigens as a predictor of symptom status in *Shigella*-infected breast-fed infants. *J Pediatr*. 1992; 121(6):852-6.
62. Heimer SR, Evans DJ, Stern ME, Barbieri JT, Yahr T, Fleiszig SM. *Pseudomonas aeruginosa* utilizes the type III secreted toxin ExoS to avoid acidified compartments within epithelial cells. *PLoS One*. 2013; 8(9):e73111.
63. Høiby N, Ciofu O, Bjarnsholt T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiol*. 2010; 5(11):1663-74.
64. Holloway BW. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol*. 1955; 13(3):572-81.
65. Horsman SR, Moore RA, Lewenza S. Calcium chelation by alginate activates the type III secretion system in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One*. 2012; 7(10):e46826.
66. Houben EN, Korotkov KV, Bitter W. Take five - Type VII secretion systems of *Mycobacteria*. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1843(8):1707-16.
67. Howell HA, Logan LK, Hauser AR. Type III secretion of ExoU is critical during early *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *MBio*. 2013; 4(2):e00032-13.
68. Hsu YC, Chen CH, Lin MC, Tsai CR, Liang JT, Wang TM. Changes in preterm breast milk nutrient content in the first month. *Pediatr Neonatol*. 2014; 55(6):449-54.

69. Hurley WL, Theil PK. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*. 2011; 3(4):442-74.
70. Jain M, Ramirez D, Seshadri R, Cullina JF, Powers CA, Schulert GS, Bar-Meir M, Sullivan CL, McColley SA, Hauser AR. Type III secretion phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strains change during infection of individuals with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):5229-37.
71. Jefferies JM, Cooper T, Yam T, Clarke SC. *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in the neonatal intensive care unit--a systematic review of risk factors and environmental sources. *J Med Microbiol*. 2012; 61(Pt 8):1052-61.
72. Jensen PØ, Givskov M, Bjarnsholt T, Moser C. The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 59(3):292-305.
73. Kawano A, Emori Y. Changes in maternal secretory immunoglobulin a levels in human milk during 12 weeks after parturition. *Am J Hum Biol*. 2013; 25(3):399-403.
74. Kida Y, Higashimoto Y, Inoue H, Shimizu T, Kuwano K. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF-kappaB through protease-activated receptors. *Cell Microbiol*. 2008; 10(7):1491-504.
75. Kim J, Ahn K, Min S, Jia J, Ha U, Wu D, et al. Factors triggering type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2005; 151(Pt 11):3575-87.
76. Kim K, Pickering LK, DuPont HL, Sullivan N, Wilkins T. In vitro and in vivo neutralizing activity of human colostrum and milk against purified toxins A and B of *Clostridium difficile*. *J Infect Dis*. 1984; 150(1):57-62.
77. Klockgether J, Munder A, Neugebauer J, Davenport CF, Stanke F, Larbig KD, et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol*. 2010; 192(4):1113-21.
78. Köhler T, Ouertatani-Sakouhi H, Cosson P, van Delden C. QsrO a novel regulator of quorum-sensing and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 2014; 9(2):e87814.
79. Komoriya K, Shibano N, Higano T, Azuma N, Yamaguchi S, Aizawa SI. Flagellar proteins and type III-exported virulence factors are the predominant proteins secreted into the culture media of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*. 1999; 34(4):767-79.

80. LaBauve AE, Wargo MJ. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. Curr Protoc Microbiol. 2012; Chapter 6:Unit 6E.1
81. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680-5.
82. Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Rodríguez JM, Boza J, Xaus J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. Br J Nutr. 2007; 98 Suppl 1:S96-100.
83. Lavoie EG, Wangdi T, Kazmierczak BI. Innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* infection. Microbes Infect. 2011; 13(14-15):1133-45.
84. Li L, Ledizet M, Kar K, Koski RA, Kazmierczak BI. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for rapid and quantitative assessment of Type III virulence phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2005; 4:22
85. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(4):582-610.
86. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock, Biología de Microorganismos. 12^{ma} ed. Madrid: Pearson Education; 2009.
87. Majumdar AS, Ghose AC. Protective properties of anticholera antibodies in human colostrum. Infect Immun. 1982; 36(3):962-5.
88. Mandsberg LF, Ciofu O, Kirkby N, Christiansen LE, Poulsen HE, Høiby N. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(6):2483-91.
89. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. Mucosal Immunol. 2011; 4(6):603-11.
90. Markou P, Apidianakis Y. Pathogenesis of intestinal *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cancer. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 3:115.
91. Marmet C. Manual expression of breast milk: Marmet technique. Franklin Park, Pamphlet N° 107: La Leche League; 1981.

92. Masinick SA, Montgomery CP, Montgomery PC, Hazlett LD. Secretory IgA inhibits *Pseudomonas aeruginosa* binding to cornea and protects against keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1997; 38(5):910-8.
93. Mauch RM, Levy CE. Serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis as a diagnostic tool: a systematic review. J Cyst Fibros. 2014; 13(5):499-507.
94. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49(4):1306-11.
95. Morrow AL, Rangel JM. Human milk protection against infectious diarrhea: implications for prevention and clinical care. Semin Pediatr Infect Dis. 2004; 15(4):221-8.
96. Moss J, Ehrmantraut ME, Banwart BD, Frank DW, Barbieri JT. Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. Infect Immun. 2001; 69(2):1185-8.
97. Moss J, Ehrmantraut ME, Banwart BD, Frank DW, Barbieri JT. Sera from adult patients with cystic fibrosis contain antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* type III apparatus. Infect Immun. 2001; 69(2):1185-8.
98. Moya A, Callicó A, Cedré B, Camacho F, Simon A, Almenares J, et al. Evaluación de la respuesta de anticuerpos hacia antígenos de *Pseudomonas aeruginosa*. Vaccimonitor. 2007; 16(1):5-11.
99. Nathwani D, Raman G, Sulham K, Gavaghan M, Menon V. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control. 2014; 3(1):32.
100. Neely AN, Holder IA, Wiener-Kronish JP, Sawa T. Passive anti-PcrV treatment protects burned mice against *Pseudomonas aeruginosa* challenge. Burns. 2005; 31(2):153-8.
101. Nelson DL, Cox MN. Lehninger, Principios de Bioquímica. 5^{ta} ed. Barcelona: Omega; 2009.
102. Nguyen TL, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? Dis Model Mech. 2015; 8(1):1-16.

103. Noguera-Obenza M, Ochoa TJ, Gomez HF, Guerrero ML, Herrera-Insua I, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Guzman CA, Cleary TG. Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(5):545-51.
104. O'Callaghan J, Reen FJ, Adams C, O'Gara F. Low oxygen induces the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* via modulation of the small RNAs rsmZ and rsmY. *Microbiology.* 2011; 157(Pt 12):3417-28.
105. Ochoa CD, Alexeyev M, Pastukh V, Balczon R, Stevens T. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin Y is a promiscuous cyclase that increases endothelial tau phosphorylation and permeability. *J Biol Chem.* 2012; 287(30):25407-18.
106. Ochoa TJ, Cleary TG. Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie.* 2009; 91(1):30-4.
107. Oda M, Cowell JL, Burstyn DG, Thaib S, Manclark CR. Antibodies to *Bordetella pertussis* in human colostrum and their protective activity against aerosol infection of mice. *Infect Immun.* 1985; 47(2):441-5.
108. Okuda J, Hayashi N, Okamoto M, Sawada S, Minagawa S, Yano Y, et al. Translocation of *Pseudomonas aeruginosa* from the intestinal tract is mediated by the binding of ExoS to an Na,K-ATPase regulator, FXYD3. *Infect Immun.* 2010; 78(11):4511-22.
109. Palmeira P, Carbonare SB, Amaral JA, Tino-De-Franco M, Carneiro-Sampaio MM. Colostrum from healthy Brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactive with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Eur J Pediatr.* 2005; 164(1):37-43.
110. Parissi-Crivelli A, Parissi-Crivelli JM, Girón JA. Recognition of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(7):2696-700.
111. Peterson R, Cheah WY, Grinyer J, Packer N. Glycoconjugates in human milk: protecting infants from disease. *Glycobiology.* 2013; 23(12):1425-38.
112. Pichardo Reyes EA, Bale MJ, Cannon WH, Matsen JM. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production on Tech agar. *J Clin Microbiol.* 1981; 13(3):456-8.
113. Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int J Med Microbiol.* 2007; 297(5):277-95.

114. Psoter KJ, De Roos AJ, Wakefield J, Mayer J, Rosenfeld M. Season is associated with *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in young children with cystic fibrosis. Clin Microbiol Infect. 2013; 19(11):E483-9.
115. Rangel SM, Logan LK, Hauser AR. The ADP-ribosyltransferase domain of the effector protein ExoS inhibits phagocytosis of *Pseudomonas aeruginosa* during pneumonia. MBio. 2014; 5(3):e01080-14.
116. Rietsch A, Mekalanos JJ. Metabolic regulation of type III secretion gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 2006; 59(3):807-20.
117. Rolsma SL, Frank DW. In vitro assays to monitor the activity of *Pseudomonas aeruginosa* Type III secreted proteins. Methods Mol Biol. 2014; 1149:171-84.
118. Sawa T, Ito E, Nguyen VH, Haight M. Anti-PcrV antibody strategies against virulent *Pseudomonas aeruginosa*. Hum Vaccin Immunother. 2014; 10(10):2843-52.
119. Sawa T, Yahr TL, Ohara M, Kurahashi K, Gropper MA, Wiener-Kronish JP, et al. Active and passive immunization with the *Pseudomonas* V antigen protects against type III intoxication and lung injury. Nat Med. 1999; 5(4): 392-8.
120. Schoehn G, Di Guilmi AM, Lemaire D, Attree I, Weissenhorn W, Dessen A. Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. EMBO J. 2003; 22(19):4957-67.
121. Sennhauser FH, Macdonald RA, Robertson DM, Hosking CS. Comparison of concentration and avidity of specific antibodies to *E. coli* in breast milk and serum. Immunology. 1989; 66(3):394-7.
122. Shafikhani SH, Engel J. *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted toxin ExoT inhibits host-cell division by targeting cytokinesis at multiple steps. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006; 103(42):15605-10.
123. Shen DK, Filopon D, Chaker H, Boullanger S, Derouazi M, Polack B, et al. High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites. Microbiology. 2008; 154(Pt 8):2195-208.
124. Skaug K, Otnaess AB, Orstavik I, Jerve F. Chlamydial secretory IgA antibodies in human milk. Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C. 1982; 90(1):21-5.
125. Sorour MH, Hani HA, Shaalan HF, El-Sayed MMH. Experimental screening of some chelating agents for calcium and magnesium removal from saline solutions. Desalination

- Water Treatment [Internet]. 2015. [Cited 2016 Mar 29]. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19443994.2015.1111595>
126. Stoliar OA, Pelley RP, Kaniecki-Green E, Kkaus MH, Carpenter CC. Secretory IgA against enterotoxins in breast-milk. *Lancet*. 1976; 1(7972):1258-61.
 127. Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2002; 110(2 Pt 1):285-91.
 128. Takahashi T, Yoshida Y, Hatano S, Sugita-Konishi Y, Igimi S, Yajima M, et al. Reactivity of secretory IgA antibodies in breast milk from 107 Japanese mothers to 20 environmental antigens. *Biol Neonate*. 2002; 82(4):238-42.
 129. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:361590.
 130. Tino De Franco M, Vieira PD, Santos SM, Ferreira TL, Araújo ED, Quintal VS, et al. Neutralizing activity and secretory IgA antibodies reactive with rotavirus SA-11 (serotype G3) in colostrum and milk from Brazilian women. *Paediatr Int Child Health*. 2013; 33(2):102-7.
 131. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76(9):4350-4.
 132. Turin CG, Ochoa TJ. The Role of Maternal Breast Milk in Preventing Infantile Diarrhea in the Developing World. *Curr Trop Med Rep*. 2014; 1(2):97-105.
 133. Turin CG, Zea-Vera A, Pezo A, Cruz K, Zegarra J, Bellomo S, et al. Lactoferrin for prevention of neonatal sepsis. *Biometals*. 2014; 27(5):1007-16.
 134. Turner KH, Everett J, Trivedi U, Rumbaugh KP, Whiteley M. Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* acute burn and chronic surgical wound infection. *PLoS Genet*. 2014; 10(7):e1004518.
 135. Vance RE, Rietsch A, Mekalanos JJ. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. *Infect Immun*. 2005; 73(3):1706-13.
 136. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol*. 2014; 5:520.

137. Willcox MD. *Pseudomonas aeruginosa* infection and inflammation during contact lens wear: a review. *Optom Vis Sci.* 2007; 84(4):273-8.
138. Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes.* 2012; 3(1):4-14.
139. Yahr TL, Wolfgang MC. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol.* 2006; 62(3):631-40.
140. Yolken RH, Wyatt RG, Mata L, Urrutia JJ, García B, Chanock RM, et al. Secretory antibody directed against rotavirus in human milk--measurement by means of enzyme-linked immunosorbent assay. *J Pediatr.* 1978; 93(6):916-21.