



Universidad Pública de Navarra  
Nafarroako Unibertsitate Publikoa



Instituto de Agrobiotecnología  
Agrobioteknologiako Institutua



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
AGRONÓMICA Y BIOCENCIAS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARITZAKO ETA  
BIOZIENTZIETAKO GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

*ESTUDIO DE LA DINÁMICA DE CRECIMIENTO EN FASES PLANCTÓNICA Y BIOFILM  
DE CO-CULTIVOS BACTERIANOS DE RELEVANCIA CLÍNICA EN PACIENTES  
RESPIRATORIOS CRÓNICOS*

presentado por

*ANDER LOPEZ IMAS*

*aurkeztua*

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

*GRADUA BIOTEKNOLOGIAN*

Mayo, 2024 / *Urtea, hilabetea*

# ÍNDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	3
<b>2. LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
3.1 Sistema respiratorio humano.....	7
3.1.1 Eubiosis y disbiosis en el tracto respiratorio inferior humano.....	7
3.2 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).....	8
3.2.1 Exacerbaciones de EPOC.....	8
3.3 <i>Haemophilus influenzae</i> : patógeno oportunista en pacientes EPOC.....	9
3.3.1 Patogénesis.....	9
3.3.2 Mecanismos de resistencia antibiótica de <i>H. influenzae</i> .....	10
3.3.3 Formación de biofilms como estilo de vida bacteriano.....	10
3.3.4 <i>Fusobacterium nucleatum</i> : patógeno periodontal que impacta en la progresión de la EPOC.....	11
3.3.5 <i>Streptococcus pneumoniae</i> : patógeno respiratorio que convive con <i>H. influenzae</i> .....	12
3.4 Manipulación genética en <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	13
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	15
<b>5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	19
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	20
6.1 Cepas y medios de cultivo.....	20
6.2 Preparación de material para ensayo de evaluación de efecto anti-biofilm con (E)-trans-2-nonenal.....	21
6.2.1 Análisis cuantitativo de metabolitos excretados.....	25
6.3 Análisis de la dinámica de cultivo y co-cultivos de <i>S. pneumoniae</i> y NTHi.....	27
6.3.1 Cultivo individual y mixto de neumococo y NTHi en fase biofilm.....	27
6.3.2 Cultivo individual y mixto de neumococo y NTHi en fase planctónica.....	30
6.4 Manipulación del plásmido pBGC02 para generación de mutantes en <i>F. nucleatum</i> ATCC23726.....	31
<b>7. RESULTADOS</b> .....	34
7.1 Análisis del efecto de (E)-trans-2-nonenal en la formación de biofilms de <i>H. influenzae</i> y <i>F. nucleatum</i> .....	34
7.1.1 Efecto de (E)-trans-2-nonenal en la viabilidad de bacterias en suspensión/fase planctónica.....	34
7.1.2 Efecto de (E)-trans-2-nonenal en la viabilidad bacteriana en fase biofilm.....	35
7.1.3 Cuantificación de metabolitos excretados en mono- y co-cultivos <i>H. influenzae</i> - <i>F. nucleatum</i> .....	37
7.2 Análisis de la dinámica de co-cultivo entre <i>H. influenzae</i> y serotipos emergentes de <i>S. pneumoniae</i> .....	37
7.2.1 Análisis de la dinámica de co-cultivo <i>H. influenzae</i> -serotipos emergentes de <i>S. pneumoniae</i> , en fase planctónica.....	38
7.2.2 Análisis de la dinámica de co-cultivo <i>H. influenzae</i> -serotipos emergentes de <i>S. pneumoniae</i> , en fase biofilm.....	39
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	43
8.1 Efecto anti-biofilm de (E)-trans-2-nonenal sobre <i>H. influenzae</i> RdKW20 y <i>F. nucleatum</i> ATCC25586.....	43
8.2 Dinámica de la interacción entre <i>S. pneumoniae</i> y <i>H. influenzae</i> .....	44
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	45
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación anatómica del sistema respiratorio.....	7
<b>Figura 2.</b> Eubiosis en vías respiratorias bajas .....	8
<b>Figura 3.</b> Etapas de formación de biofilm.....	11
<b>Figura 4.</b> Formación de biofilm en mono- y co-cultivos de NTHi – <i>S. pneumoniae</i> .....	13
<b>Figura 5.</b> Modificaciones del plásmido pBGC02 en la literatura.....	14
<b>Figura 6.</b> Efecto de ampicilina, (E)-trans-2-nonenal y (E)-3-decen-2-one en la formación de biofilm por tres aislados clínicos de <i>H. influenzae</i> .....	15
<b>Figura 7.</b> Efecto de ampicilina, (E)-trans-2-nonenal y (E)-3-decen-2-one en biofilms preformados de NTHi. ....	16
<b>Figura 8.</b> Estructura de plásmido pBGC02.....	17
<b>Figura 9.</b> Flujo de trabajo con plásmido pBGC02 .....	18
<b>Figura 10.</b> Diseño experimental para análisis del efecto antibiofilm de (E)-trans-2-nonenal. ....	24
<b>Figura 11.</b> Diagrama de la producción de ácido acético, fórmico y succínico .....	25
<b>Figura 12.</b> Distribución de placa de 96X para análisis de metabolitos.....	25
<b>Figura 17.</b> Mono- y co-cultivo Spn-NTHi en ensayo de tipo biofilm. ....	29
<b>Figura 18.</b> Cebadores regiones <i>Up</i> y <i>Down</i> .....	32
<b>Figura 19.</b> Recuento de bacterias viables en fase planctónica tras ensayo de 24 h. ....	34
<b>Figura 20.</b> Recuento de bacterias viables en fase planctónica tras ensayo de 48 h .....	35
<b>Figura 21.</b> Recuento de bacterias viables en fase biofilm tras ensayo de 24 h,.....	35
<b>Figura 22.</b> Recuento de bacterias viables en fase biofilm tras ensayo de 48 h.....	36
<b>Figura 23.</b> Cuantificación de los niveles de ácido acético, fórmico y succínico excretados .....	37
<b>Figura 24.</b> Recuento de bacterias viables en mono- y co-cultivos Spn-NTHi.....	38
<b>Figura 25.</b> Recuento de bacterias viables en mono- y co-cultivos Spn-NTHi en Biofilm.....	39
<b>Figura 26.</b> Cuantificación de formación de biofilm mediante tinción con cristal violeta.....	40
<b>Figura 27.</b> Recuento de bacterias viables en mono- y co-cultivos Spn-NTHi R2866 y P621 .....	41
<b>Figura 28.</b> Separación electroforética de productos de amplificación para ingeniería genética de <i>F. nucleatum</i> ATCC23726.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diluciones cultivos NTHi RdKW20 – <i>F. nucleatum</i> 25586.....	23
<b>Tabla 2.</b> Diluciones experimento NTHi – neumococo fase biofilm. ....	28
<b>Tabla 3.</b> Diluciones experimento NTHi – neumococo fase planctónica. ....	30

## 1. RESUMEN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es una afección respiratoria que se caracteriza por una obstrucción persistente del flujo de aire y está asociada a una alta mortalidad y morbilidad. Las exacerbaciones agudas, frecuentemente asociadas a infecciones bacterianas, son complicaciones comunes en la EPOC. *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* son dos patógenos habituales en estos casos. Además, patógenos periodontales como *Fusobacterium nucleatum* se alojan en los pulmones de estos pacientes respiratorios. Por su parte, *H. influenzae* es un patógeno oportunista que forma biopelículas, estructuras que protegen a las bacterias tanto de los antibióticos como del sistema inmunitario del huésped, dificultando su eliminación. Este Trabajo de Fin de Grado explora la interacción de *H. influenzae* con otros patógenos con los que convive en el pulmón de pacientes que sufren EPOC, así como el efecto de compuestos anti-biofilm en la formación y viabilidad de los mismos. Por una parte, se investigó el impacto del (E)-trans-2-nonenal, un análogo de cinamaldehído, en la inhibición de la formación de biopelículas de *H. influenzae* y *F. nucleatum*. Por otra parte, se analizó la dinámica de co-cultivos de *H. influenzae* con aislados clínicos de *S. pneumoniae* de serotipos emergentes en el actual contexto de vacunación anti-neumocócica.

Finalmente, se exploró el diseño de estrategias de manipulación genética de *F. nucleatum* consistentes en la generación de *cassettes* de disrupción génica en un plásmido no replicativo, aplicado al diseño de herramientas de inactivación del gen que codifica una ornitina descarboxilasa en este patógeno periodontal, una enzima clave en el metabolismo de las poliaminas y la formación de biopelículas.

En conjunto, este Trabajo de Fin de Grado ha generado información relevante sobre la dinámica de la interacción entre distintos patógenos con importancia clínica en pacientes respiratorios crónicos como es el caso de los pacientes que sufren EPOC.

**Palabras clave:** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusobacterium nucleatum*, co-cultivos, biofilms

## ABSTRACT

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a common respiratory condition characterized by persistent airflow obstruction, and it is associated with high mortality and morbidity. Acute exacerbations, often associated to bacterial infections, are common complications in COPD patients. *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* are two of the common pathogens in this scenario. Moreover, periodontal pathogens such as *Fusobacterium nucleatum* is commonly found in the lower airways of respiratory patients. *H. influenzae* is an opportunistic pathogen that forms biofilms, structures that protect bacteria from both antibiotics and the host immune system, making them difficult to eradicate. This Final Degree Project explores the interaction between *H. influenzae* and other pathogens that often co-exist in the lower airways of COPD patients, together with the effect of anti-biofilm compounds on the formation and viability of these bacterial biofilms. Firstly, we investigated the anti-biofilm effect of (E)-trans-2-nonenal, a cinnamaldehyde analog, on the formation of biofilms of *H. influenzae* and *F. nucleatum*. Secondly, we investigated the culturing dynamics of *H. influenzae* with *S. pneumoniae* strains belonging to emergent serotypes in the current anti-pneumococcal vaccination context.

Finally, we explored the design of strategies for *F. nucleatum* genetic manipulation, based on the generation of gene disruption *cassettes* cloned in a non-replicative plasmid, applied to the design of tools to inactivate the gene encoding an ornithine decarboxylase, a key enzyme in *F. nucleatum* polyamine metabolism and biofilm formation.

Altogether, this Final Degree Project has generated relevant information on the interaction dynamics between bacterial pathogens of clinical relevance in chronic respiratory patients such as those suffering COPD.

**Keywords:** Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Fusobacterium nucleatum*, co-cultures, biofilm

## 2. LISTA DE ABREVIATURAS

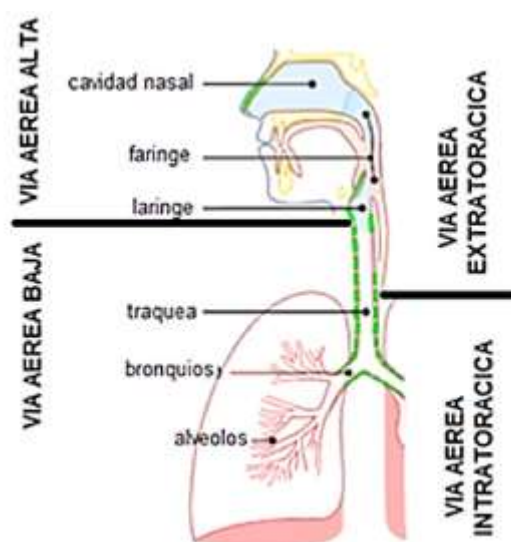
ADN	ácido desoxirribonucleico / ADP	adenosín difosfato
AI-2	autoinductor 2	
ARN	ácido ribonucleico	
ATP	adenosín trifosfato	
BHI	infusión cerebro-corazón (Brain Heart Infusion)	
CAT	cloranfenicol acetiltransferasa	
CFU	unidad formadora de colonias	
CMI	concentración mínima inhibitoria	
CoA	coenzima A	
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono	
D-LDH	D-lactato deshidrogenasa	
DMSO	dimetilsulfóxido	
dNTP	desoxinucleótido trifosfato	
EPOC	enfermedad pulmonar obstructiva crónica	
EPS	sustancia polimérica extracelular	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
FDH	formiato deshidrogenasa	
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	
H <sub>2</sub> O	agua	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrógeno	
HTM	medio de prueba de Haemophilus (Haemophilus Test Medium)	
LB	Luria Bertani	
M	molar	
mL	mililitro	
MEB	microscopía electrónica de barrido	
mM	milimolar	
NAD	dinucleótido de nicotinamida y adenina	
NADH	dinucleótido de nicotinamida y adenina reducida	
NK	células asesinas naturales (natural killer)	
NTHi	<i>Haemophilus influenzae</i> no tipificable	
OD	densidad óptica	

PBS tampón fosfato salino  
PB pares de bases  
PCR reacción en cadena de la polimerasa  
PEP fosfoenolpiruvato  
P<sub>i</sub> fosfato inorgánico  
PK piruvato quinasa  
*P. gingivalis* *Porphyromonas gingivalis*  
PRP polirribitol ribosa fosfato  
PTA fosfotransacetilasa  
PVX-agar agar-chocolate PolyVitex  
QS quorum sensing  
r.p.m revoluciones por minuto  
SCS succinil-CoA sintetasa  
*S. pneumoniae* *Streptococcus pneumoniae*  
TFG Trabajo de Fin de Grado  
TSB caldo soja tripsicaseína  
μg microgramo  
μL microlitro

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1 Sistema respiratorio humano

El sistema respiratorio cumple una función vital para el ser humano: la oxigenación de la sangre. Anatómicamente, las vías aéreas se dividen en altas y bajas o tracto respiratorio superior e inferior, siendo extra- e intratorácicas, respectivamente (**Figura 1**). En las vías aéreas altas, la nariz posee características anatómicas que le permiten realizar su función protectora. Los cornetes, estructuras altamente vascularizadas y con una gran área de exposición, concentran el aire en una corriente pequeña, filtrando, calentando y humidificando el aire que entra en la nariz. En el tracto respiratorio inferior, en concreto en los alveolos pulmonares, tiene lugar el intercambio gaseoso. Se estima que el pulmón humano tiene entre 300 y 480 millones de alvéolos, cada uno con entre 500 y 1000 capilares, por lo que la superficie total donde se puede dar el intercambio gaseoso es de aproximadamente 320 m<sup>2</sup> ya en niños (Neumología Pediátrica, 2021).



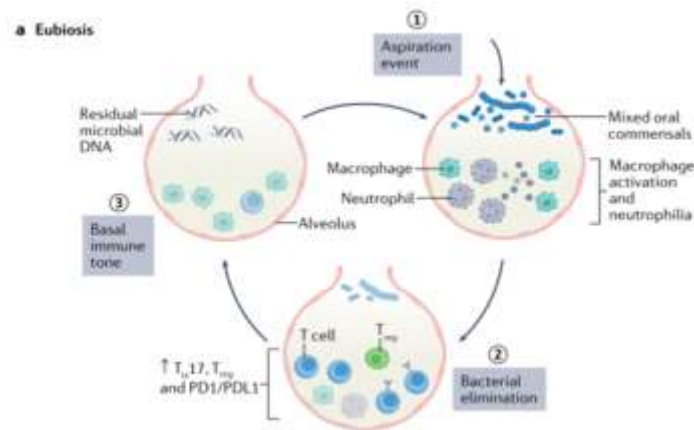
**Figura 1.** Clasificación anatómica del sistema respiratorio.

##### 3.1.1 Eubiosis y disbiosis en el tracto respiratorio inferior humano

Históricamente, los pulmones han sido considerados estériles, hasta la llegada de las técnicas de secuenciación masiva, independientes de cultivo, que mostraron la existencia de una microbiota pulmonar que, en personas sanas, alberga numerosas especies bacterianas, siendo los principales géneros *Prevotella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Veillonella spp.*, *Fusobacterium spp.* y *Haemophilus spp.*, así como diferentes especies de virus y hongos. En pulmones sanos, la concentración de microbiota es de entre 10<sup>3</sup> y 10<sup>5</sup> bacterias/gr de tejido, mucho menor que en otros nichos corporales como el intestino, donde asciende a 10<sup>11</sup>. Los miembros de la microbiota pulmonar llegan a vías respiratorias bajas mediante microaspiraciones desde nariz y boca a través de la orofaringe. Dada la conexión anatómica boca-pulmón (*oral-lung axis*) parte de la microbiota pulmonar está formada por microorganismos orales. En estado de eubiosis en individuos sanos con función pulmonar normal, la barrera mucociliar y la tos limitan la llegada de microorganismos a vías respiratorias bajas; además, esta llegada activa el sistema inmunitario del hospedador, en concreto de macrófagos y neutrófilos, que reclutan los linfocitos T helper 17 y linfocitos T reguladores (T<sub>H</sub>17 y T<sub>reg</sub> respectivamente), resultando en la eliminación de



los patógenos, tras lo cual se vuelve al estado basal (**Figura 2**) (Natalini, 2023). Este estado de equilibrio u homeostasis eubiótica puede verse alterado debido a factores genéticos o exógenos, como son la exposición a agentes contaminantes, gases nocivos como el humo del tabaco, o la administración de fármacos anti-inflamatorios, antibióticos, u otros. Estas alteraciones de la homeostasis pulmonar producen disbiosis del microbioma pulmonar, consistente en el aumento de la carga bacteriana pulmonar en conjunto, con disminución de comensales y aumento de microorganismos potencialmente patógenos. Esta disbiosis, que a su vez afecta a la función pulmonar, tiene lugar en diferentes enfermedades pulmonares como la fibrosis quística o la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) (Wypych, 2019).



**Figura 2.** Eventos que tienen lugar en vías respiratorias bajas para mantener un estado de eubiosis (Wypych, 2019).

### 3.2 Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) es la tercera causa de muerte a nivel global, con ~3 millones de muertes anuales. Esta es una enfermedad multifactorial de carácter genético cuyo principal factor de riesgo es la exposición a gases nocivos como los provocados por el tabaquismo. Sus síntomas son obstrucción crónica del flujo aéreo, destrucción del parénquima pulmonar, fibrosis, inflamación e hipersecreción mucosa. Por sexos, en personas con masa corporal comparable, los pulmones tienen mayor capacidad en hombres, mientras que las partículas procedentes del humo del tabaco se depositan más en el sistema respiratorio de mujeres. Por ello, el pronóstico de la EPOC es peor en individuos de sexo femenino que masculino, siendo las hospitalizaciones y los fallecimientos por EPOC más frecuentes en mujeres que en hombres. Pese a estas diferencias, no existen variaciones entre tratamientos según el sexo (Somayaji, 2022). En términos generales, la base de los tratamientos de la EPOC es el uso de medicamentos inhalados que dilatan las vías respiratorias, principalmente broncodilatadores, que pueden ser de acción prolongada o de acción breve. Estos últimos comienzan a actuar al instante de su administración, y su efecto dura entre 4 y 6 horas, siendo usados principalmente durante episodios de exacerbaciones (Organización Mundial de la Salud, 2023).

#### 3.2.1 Exacerbaciones de EPOC

Las exacerbaciones en pacientes que sufren EPOC son períodos de empeoramiento agudo de los síntomas respiratorios. Surgen repentinamente en un corto período de tiempo y conllevan el aumento del tratamiento farmacológico. Los síntomas son tos, generación de esputo, dificultad para respirar, fatiga y fiebre (Dickson, 2014). Aproximadamente la mitad de las exacerbaciones están causadas o son

desencadenadas por infecciones, víricas o bacterianas. Entre las de origen bacteriano, siendo las más importantes-frecuentes las asociadas a *Hemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las exacerbaciones son tratadas con ciclos de antibióticos. La recuperación fisiológica después de una exacerbación suele ser incompleta, lo que disminuye progresivamente la calidad de vida de los pacientes, es decir, a medida que avanza la enfermedad, las exacerbaciones tienden a presentar más síntomas, y aumenta el tiempo de recuperación del paciente (Wedzicha, 2003).

Otro factor clave en la disbiosis pulmonar asociada a la EPOC es la **enfermedad periodontal**. Las infecciones periodontales polimicrobianas son un conjunto de enfermedades localizadas en las encías y estructuras de soporte de los dientes producidas por patógenos periodontales que se acumulan en la placa dental. La placa dental es una comunidad polimicrobiana que forma una biopelícula envuelta en una matriz de polímeros de origen salival y bacteriano, adherida a las paredes de las piezas dentarias. En estado de eubiosis, la microbiota de la placa dental es diversa y relativamente estática, incluyendo comensales orales y patógenos periodontales (*Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, etc.) (Li et al., 2020). Factores asociados a estilo de vida, edad o intervenciones bucales provocan disbiosis de la microbiota oral y enfermedad periodontal, lo que favorece la microaspiración pulmonar de patógenos periodontales y respiratorios que, en pacientes que sufren EPOC, contribuyen a la disbiosis pulmonar persistente. Evidencias en este sentido son la detección de los patógenos periodontales *F. nucleatum*, *P. gingivalis* y *Prevotella intermedia* en pulmones de pacientes EPOC, así como el posible papel activo de *F. nucleatum* en episodios de exacerbación (Li et al., 2020).

### 3.3 *Haemophilus influenzae*: patógeno oportunista en pacientes EPOC

*H. influenzae* es un cocobacilo Gramnegativo de la familia *Pasteurellaceae* (NCBI Taxonomy ID: 727). Aislado exclusivamente en muestras humanas, *H. influenzae* es inmóvil, anaerobio facultativo, y requiere de los factores de crecimiento hemina y dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD). Las cepas de esta especie pueden tener o no una cápsula polisacárida. Las cepas no encapsuladas son referidas como no tipificables (NTHi) (Agrawal & Murphy, 2011).

#### 3.3.1 Patogénesis

Las cepas capsuladas de *H. influenzae* se clasifican en seis serotipos capsulares (A, B, C, D, E, F). Existe una vacuna efectiva frente a cepas de serotipo B, causantes de infección pediátrica invasiva, es decir invade el torrente sanguíneo y se disemina a través del sistema circulatorio. Esta vacuna es de tipo conjugada, creada a partir de la unión del polisacárido capsular de polirribitol ribosa fosfato (PRP) conjugado a una proteína transportadora, como la toxina diftérica o su variante CRM197. Esta vacuna no protege frente a otros serotipos ni frente a NTHi, lo que está generando un aumento en la incidencia de cepas no tipificables.

Las cepas de NTHi colonizan las vías respiratorias altas de la mayor parte de la población sana, si bien pueden migrar a vías respiratorias bajas y causar infecciones sintomáticas. La colonización e infección son mediadas por múltiples factores de virulencia, incluyendo adhesinas, sistemas de absorción de nutrientes, y producción de moléculas como mecanismo de defensa frente al sistema inmune del hospedador. Una de las estrategias de infección y supervivencia de NTHi es la formación de biopelículas o biofilms, observados en las afecciones de otitis media y en vías respiratorias de pacientes que sufren EPOC, donde es un patógeno frecuentemente asociado con la ocurrencia de exacerbaciones (Agrawal & Murphy, 2011).

### 3.3.2 Mecanismos de resistencia antibiótica de *H. influenzae*

Los mecanismos de resistencia antibiótica de *H. influenzae* incluyen, entre otros, la producción de  $\beta$ -lactamasas (codificadas por los genes TEM-1 o ROB-1), y la actividad reducida de las proteínas de unión a penicilina (PBP, penicillin binding proteins), por mutaciones en el gen *ftsI*, lo que conlleva la aparición de cepas resistentes a ampicilina y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos frecuentemente empleados en la práctica clínica (Agrawal & Murphy, 2011). Ambos mecanismos combinados dan como resultado cepas resistentes a ácido amoxicilina-clavulánico (Xiao et al., 2024), lo que dificulta el tratamiento de las infecciones con las estrategias antibióticas actuales. Además, la formación de biofilms genera protección antibiótica, de forma que es necesario aumentar las dosis de antibiótico para conseguir eficacia en el tratamiento, lo que puede generar efectos secundarios adversos además de desarrollo de resistencias que restan efectividad. Actualmente, no existen fármacos anti-biofilm aprobados por las agencias reguladoras (FDA y EMA), si bien existe un campo activo de investigación para el desarrollo de tratamientos con agentes dispersantes de biofilms que faciliten la acción de los antibióticos (Islam & Reid, 2024).

### 3.3.3 Formación de biofilms como estilo de vida bacteriano

El biofilm es una forma de vida bacteriana consistente en la formación de una comunidad extracelular de bacterias que están adheridas sobre una superficie biótica o abiótica, rodeadas de una matriz de composición variable sintetizada por ellas mismas, que en conjunto aporta protección frente a elementos inmunitarios o agentes externos que pueden comprometer su viabilidad. En este estado, los miembros de las comunidades microbianas establecen interacciones entre ellas, y resisten más eficazmente el efecto de antibióticos, así como ante el propio sistema inmunológico del huésped. De forma general, la formación de biofilms bacterianos está dividida en 5 fases (Sauer et al., 2022) (**Figura 3**):

1. **Adhesión Reversible:**

- En esta fase inicial, las bacterias se adhieren de manera reversible a una superficie a través de apéndices como flagelos o fimbrias. Este tipo de adhesión no es permanente, y las células pueden desprenderse y volver al medio líquido.

2. **Adhesión Irreversible:**

- Las bacterias que deciden permanecer adheridas cambian a una adhesión irreversible. En esta etapa, se reduce la motilidad mediada por flagelos, y se incrementa la producción de componentes de la matriz del biofilm que aseguran a las bacterias firmemente a la superficie. Esta etapa también se caracteriza por la expresión de genes que confieren tolerancia a antimicrobianos.

3. **Maduración I:**

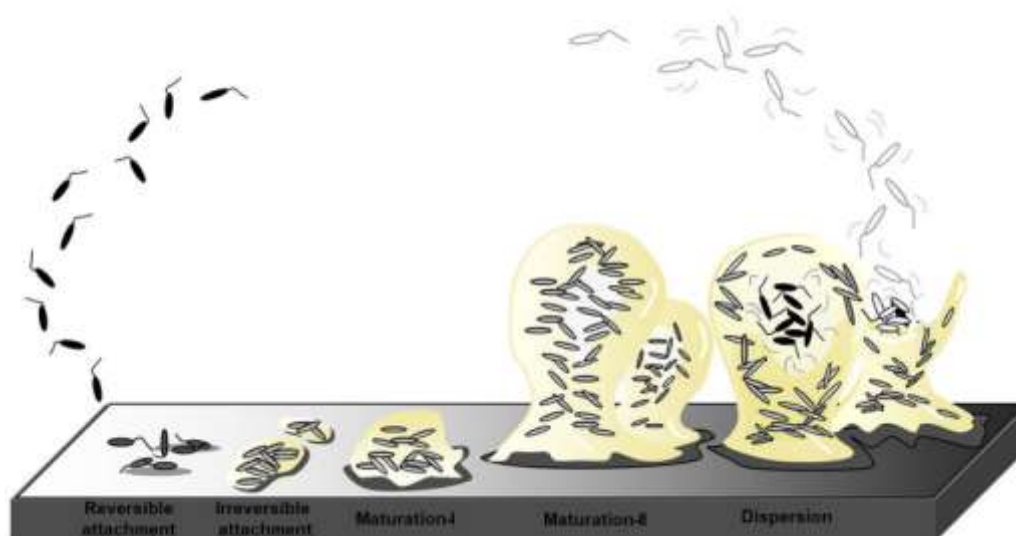
- Durante esta etapa, las células adheridas comienzan a dividirse y a formar microcolonias. Estas estructuras multicelulares empiezan a desarrollarse en grosor y complejidad, y se comienza a producir una matriz extracelular que encapsula las células bacterianas.

4. **Maduración II:**

- Las micro-colonias continúan creciendo y desarrollándose, formando estructuras más complejas como "hongos" o "pilares". Estas estructuras están intercaladas con canales llenos de líquido que permiten la difusión de nutrientes y desechos.

## 5. Dispersión:

- En la última etapa, las células del biofilm se liberan de la matriz y vuelven al estado planctónico. Este proceso de dispersión es crucial para la diseminación de bacterias a nuevas superficies donde pueden iniciar la formación de nuevos biofilms.



**Figura 3.** Etapas de formación de biofilm. Fuente: Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle—expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608–620.

Durante la fase inicial de adhesión superficial, *H. influenzae* puede unirse a células epiteliales respiratorias mediante pili tipo IV y adhesinas. Durante las etapas de proliferación y maduración, *H. influenzae* produce sustancia polimérica extracelular (*extracellular polymeric substance*, EPS), y se comunica con otras bacterias mediante un sistema *Quorum sensing* (QS), que se ha observado está implicado en la coordinación de acciones dentro de las comunidades microbianas, entre otras la formación del propio biofilm. La formación de biofilms es un fenómeno reversible, de forma que las bacterias pueden volver a un estado planctónico, y colonizar otros nichos. Dentro del biofilm, sistemas sofisticados de QS y mecanismos reguladores median la resistencia antibiótica y la evasión inmune (Xiao et al., 2024). En el caso de *H. influenzae*, la comunicación inter-bacteriana de QS está mediada por el autoinductor 2 (AI-2, autoinducer 2). Así, la enzima LuxS, codificada por el gen que lleva el mismo nombre (NCBI Gene ID: 72526612), participa en la producción de AI-2. De hecho, la generación de cepas recombinantes de *H. influenzae* donde la transcripción del gen *luxS* estaba bajo control del promotor *Pr<sub>xylA</sub>*, inducible mediante xilosa, mostró que la eliminación de xilosa del medio resultó en la represión de la expresión de *luxS* y con ello de la formación de biofilm, mostrando también que la expresión de *luxS* alcanzaba su máximo durante la maduración del biofilm (Pang B et al., 2018).

**En este Trabajo de Fin de Grado, hemos analizado el efecto de moléculas de tipo cinemaldehído en la formación de biofilms por *H. influenzae*.**

### ***3.3.4 Fusobacterium nucleatum: patógeno periodontal que impacta en la progresión de la EPOC***

*F. nucleatum* es un comensal oral anaerobio estricto y un patógeno periodontal. Es una bacteria asociada, directa o indirectamente, con diferentes patologías como periodontitis agresiva y crónica,

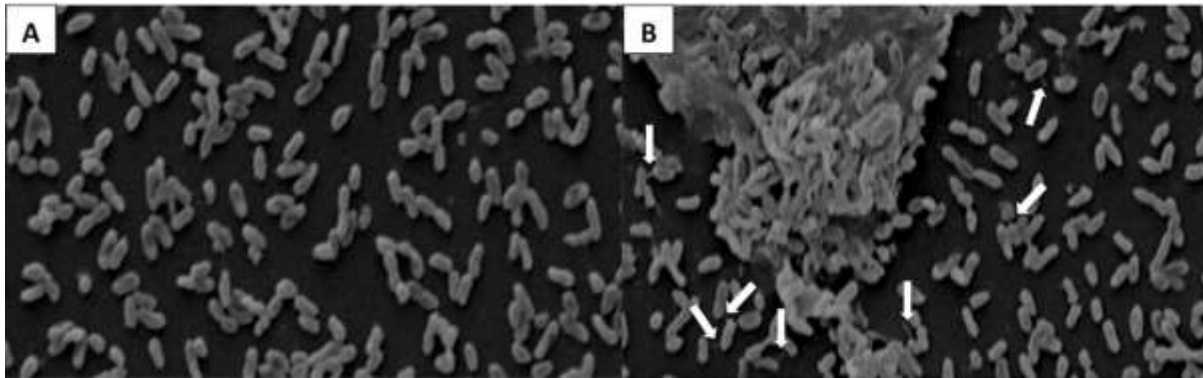
sepsis neonatal, cáncer colorrectal y la EPOC (Li et al., 2020). La abundancia de *F. nucleatum* en la boca se ve afectada por factores ambientales como el tabaquismo, que provoca un aumento en el número de bacterias de los individuos (Li et al., 2020). Su mecanismo de colonización es por adhesión a células epiteliales, monocitos, eritrocitos, fibroblastos y células natural killer (NK) (Li et al., 2020). Sólo una adhesina, FadA (NCBI locus: WP\_005903511), ha sido identificada, siendo el factor de virulencia mejor caracterizado para esta especie. Debido al posible papel activo de *F. nucleatum* en la ocurrencia de exacerbaciones de pacientes que sufren EPOC, este patógeno periodontal tiene potencial para ser un biomarcador de empeoramiento de la función pulmonar en este tipo de pacientes (Li et al., 2020). Además, es previsible que forme comunidades polimicrobianas con patógenos respiratorios en vías respiratorias bajas. Se ha documentado que *F. nucleatum* crece en co-cultivos con *P. aeruginosa* (Li et al., 2020). Por otra parte, trabajo previo en el grupo de investigación ha puesto a punto condiciones de cultivo y co-cultivo de *F. nucleatum* y *H. influenzae* en fase biofilm.

**En este Trabajo de Fin de Grado, hemos analizado el efecto de moléculas de tipo cinemaldehído en la formación de biofilms mixtos *H. influenzae*-*F. nucleatum*.**

### ***3.3.5 Streptococcus pneumoniae: patógeno respiratorio que convive con H. influenzae***

*S. pneumoniae*, conocido como neumococo, es una bacteria Gram-positiva que coloniza naturalmente la nasofaringe humana. Es causa principal de neumonía, otitis media, sinusitis y meningitis, especialmente en niños y adultos inmunocomprometidos. Posee una cápsula de polisacárido que contribuye a su virulencia, facilitando la colonización y evadiendo la respuesta inmune (Cope et al., 2011). Existen más de 100 serotipos capsulares de *S. pneumoniae*, aunque un pequeño número de los mismos causa la mayoría de las infecciones neumocócicas. Los serotipos más importantes y prevalentes son el 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, y 23F (Chang et al., 2021). Actualmente, existe una vacunación neumocócica efectiva, con dos vacunas recomendadas a población pediátrica y adulta mayor de 65 años; una de tipo polisacárida frente a 23 serotipos (VNP23) y otra conjugada frente a 13 serotipos (VNC13), (Tikhomirova y Kidd, 2013). El uso de estas vacunas reduce el impacto de los serotipos contra los que actúa, si bien tiene como efecto asociado la aparición de otros serotipos emergentes.

Fisiológicamente, *S. pneumoniae* entra en fase autolítica al inicio de la fase estacionaria en medio líquido, lo que resulta en una disminución de células viables. Además, *S. pneumoniae* comparte nicho con *H. influenzae* en vías respiratorias bajas de pacientes respiratorios crónicos; de hecho, es conocido que co-cultivos con *H. influenzae* forman biofilms más densos y poblados, y aumentan el ratio de supervivencia de *S. pneumoniae* (Hong et al., 2014). De hecho, en estos biofilms mixtos, se observó una disminución de la expresión de los genes involucrados en la autólisis de neumococo, genes *lytA*, *cbpD* y *lytC*, respecto a cultivos individuales (Hong et al., 2014). Por otra parte, *S. pneumoniae* produce peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un agente oxidante que afecta al material genético, proteínas y lípidos de NTHi (Cope et al., 2011). Como respuesta al estrés oxidativo causado por el  $H_2O_2$ , *H. influenzae* ha desarrollado mecanismos de defensa mediados, entre otros, por la actividad catalasa que transforma el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno, protegiéndola del daño oxidativo. Además, el glutatión, un tripéptido formado por glutamato, cisteína y glicina, desempeña un papel crucial en la protección contra el estrés oxidativo. El glutatión participa en la actividad peroxidasa dependiente del glutatión, descomponiendo el  $H_2O_2$ . En *H. influenzae*, la peroxidasa PgdX reduce el  $H_2O_2$  y los hidroperóxidos alquílicos a través del ciclo redox del glutatión. En ausencia de PgdX, *H. influenzae* aumenta la actividad de la catalasa para compensar la falta de eliminación del  $H_2O_2$ . (Harrison, Bakaletz, & Munson, 2012).



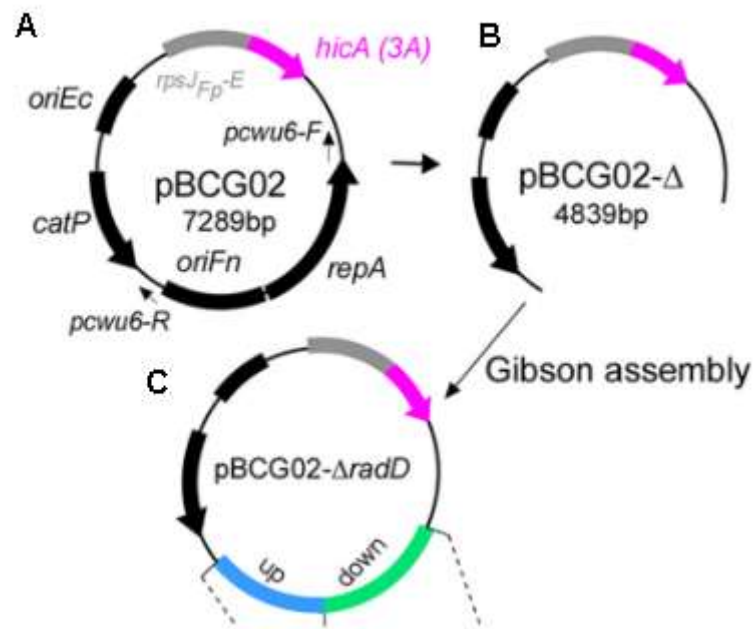
**Figura 4.** Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de monocultivos de NTHi (A) y co-cultivos NTHi-*S. pneumoniae* (B), donde se observa la formación de estructuras pili tipo IV indicadas con flechas, mientras que en monocultivo no se identifica ninguna de estas estructuras (Cope et al., 2011).

**En este Trabajo de Fin de Grado, hemos analizado la dinámica de co-cultivo *S. pneumoniae*-*H. influenzae* en el que participan aislados clínicos de *S. pneumoniae* pertenecientes a serotipos emergentes de relevancia clínica en el actual contexto vacunal VNC13.**

### 3.4 Manipulación genética de *Fusobacterium nucleatum*

El estudio de los factores de virulencia en *F. nucleatum* ha avanzado gracias al desarrollo de diversas herramientas de manipulación genética, entre las que destaca el sistema de contra-selección basado en el gen *hicA* de *Fusobacterium periodonticum*. Los investigadores responsables de este diseño descubrieron que la versión completa del gen *hicA* no es tóxica en *F. nucleatum*. Sin embargo, una versión truncada del gen, a la cual le faltan los primeros seis aminoácidos, sí actúa como una toxina funcional. HicA actúa degradando ARN mensajero, impidiendo la traducción de este a proteínas, e inhibiendo el crecimiento celular (Wu et al., 2023). El plásmido pBGC02 está diseñado para expresar la versión truncada del gen *hicA* como marcador de contra-selección en *F. nucleatum*. Este plásmido lleva incorporado además un riboswitch sensible a teofilina, de manera que sólo en presencia de ésta se expresará el gen, así como el promotor *rpsJfp* de *F. periodonticum* (Wu et al., 2023). A modo de prueba de concepto, este plásmido ha sido utilizado para generar mutantes en los genes *radD* que codifica para una adhesina involucrada en la formación de biopelícula y el gen *tnaA*, codificante de la enzima triptofanasa. Para crear estos *cassettes* de disrupción, se amplificaron secuencias de ADN flanqueantes a los genes diana denominadas *Up* y *Down*, las cuales se insertaron en el plásmido mediante Gibson *assembly*. Esto dio origen a los plásmidos pBCG02- $\Delta radD$  (Figura 5) y pBCG02- $\Delta tnaA$ . Estos fueron transformados en *F. nucleatum* por electroporación, y se integraron en el genoma mediante recombinación entre las regiones *Up* y *Down* del plásmido y su correspondiente gen en el cromosoma de la bacteria (Wu et al., 2023).

**El laboratorio receptor dispone del plásmido pBGC02, y se ha realizado el diseño y primeros pasos para la inactivación del gen que codifica la ornitina decarboxilasa de *F. nucleatum*.**



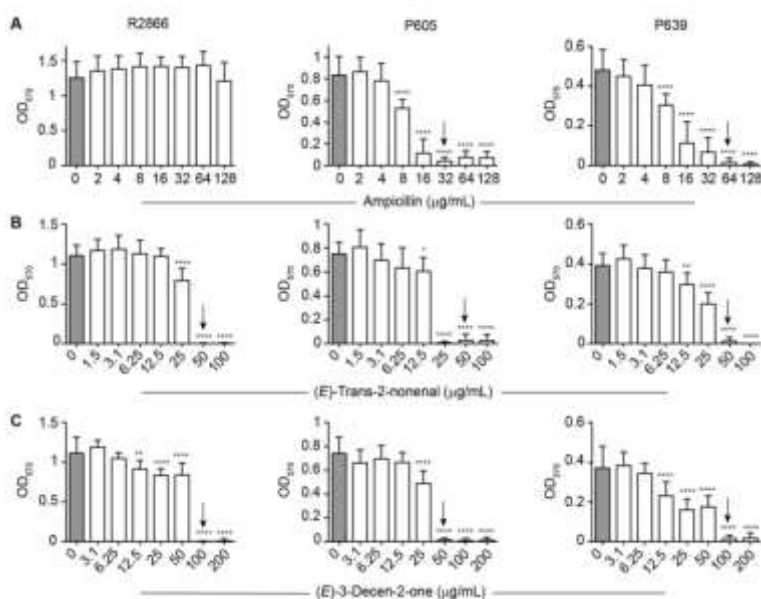
**Figura 5.** A) Esquema del plásmido pBGC02. B) Eliminación de los genes *pcwu6-R* y *repA* mediante pPCR inversa. C) Inserción de las regiones Up y Down de un gen diana (en este caso *radD*) en pBCG02 para generar un *cassette* de interrupción. Adaptada de “Wu, C., & colaboradores. (2023). HicA Toxin-Based Counterselection Marker for Allelic Exchange Mutations in *Fusobacterium nucleatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(4), e00091-23. <https://doi.org/10.1128/aem.00091-23>”



## 4. ANTECEDENTES

Este Trabajo de Fin de Grado está enmarcado dentro del grupo de trabajo liderado por la Dra. Junkal Garmendia en el Instituto de Agrobiotecnología (IdAB-CSIC), especializado en el estudio de interacciones patógeno-huésped y en la resistencia a los antibióticos de bacterias patógenas respiratorias.

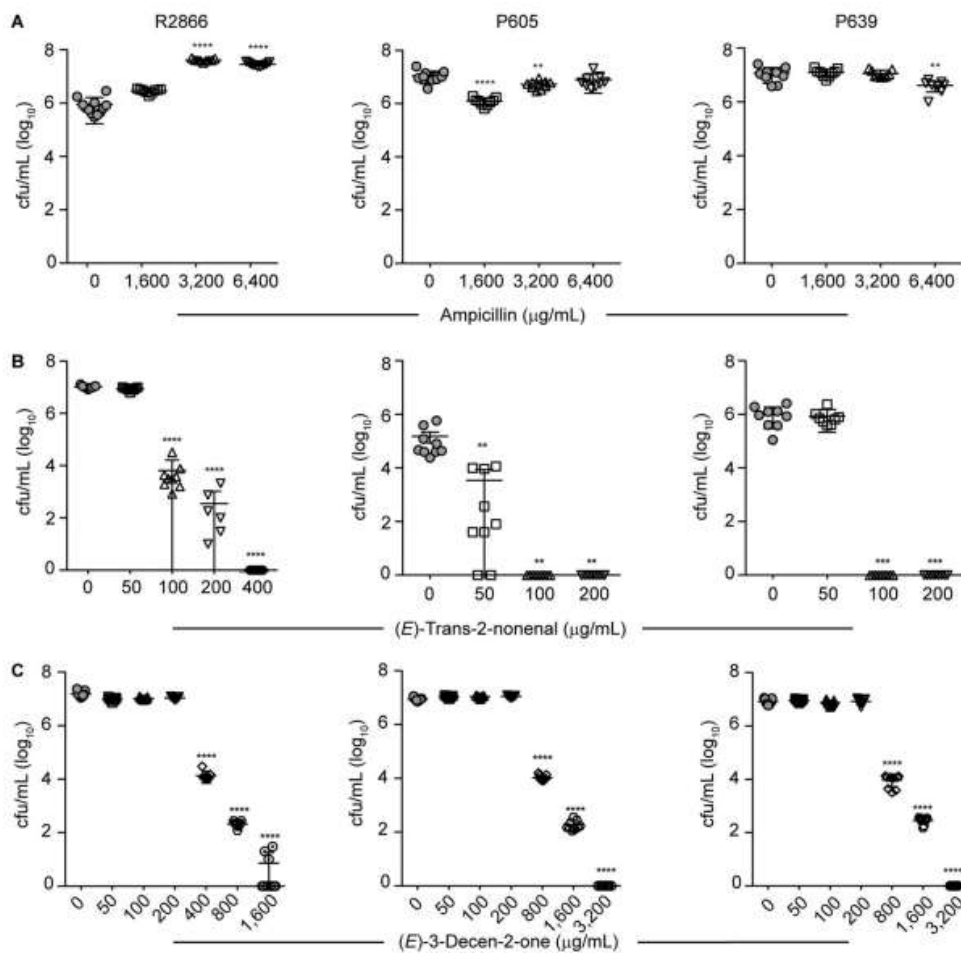
Trabajo previo del grupo de investigación recientemente publicado (Asensio-López et al., 2024) caracterizó el efecto anti-biofilm de dos análogos de cinamaldehídos, específicamente (*E*)-trans-2-nonenal y (*E*)-3-decen-2-one, frente a biofilms formado por aislados clínicos de *H. influenzae*. En concreto, en este trabajo previo se utilizaron tres cepas clínicas (R2866, P605, y P639) con diferentes niveles de resistencia a la ampicilina. Los resultados mostraron que ambos análogos de cinamaldehídos inhibieron la formación de biofilms de manera dosis-dependiente, incluso en la cepa resistente a ampicilina R2866 (**Figura 6**, tomada de Asensio-López et al., 2024).



**Figura 6.** Efecto de ampicilina (A), (*E*)-trans-2-nonenal (B) y (*E*)-3-decen-2-one en la formación de biofilm por tres aislados clínicos de *H. influenzae*. Formación de biofilm por tres cepas clínicas de NTHi en ausencia/presencia de un panel de concentraciones de fármacos, determinado mediante medidas de OD<sub>570</sub> tras tinción de biofilm con cristal violeta. Las columnas grises indican controles no tratados. Las flechas indican la concentración mínima inhibitoria (CMI). Cada barra muestra valores medios  $\pm$  SD; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,005$ ; \*\*\*,  $p < 0,0001$ . Las comparaciones estadísticas de los medios se realizaron con ONE WAY ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

Este mismo trabajo también mostró el efecto de ambos análogos sobre biofilms preformados, en ensayos de erradicación de biofilms previamente formados, tal y como se muestra en la **Figura 6**, tomada de Asensio-López et al., 2024.





**Figura 7.** Efecto de ampicilina (A), (E)-trans-2-nonenal (B) y (E)-3-decen-2-one en biofilms preformados de NTHi. Recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) en biofilms formados en tres cepas clínicas tras 6 horas de tratamiento con un rango de concentraciones de fármacos, determinado mediante disrupción mecánica y recuento de CFU. En cada caso, se muestran los valores medios  $\pm$  SD; \*\*,  $p < 0,005$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0,0001$ . Los análisis estadísticos se realizaron usando one way ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

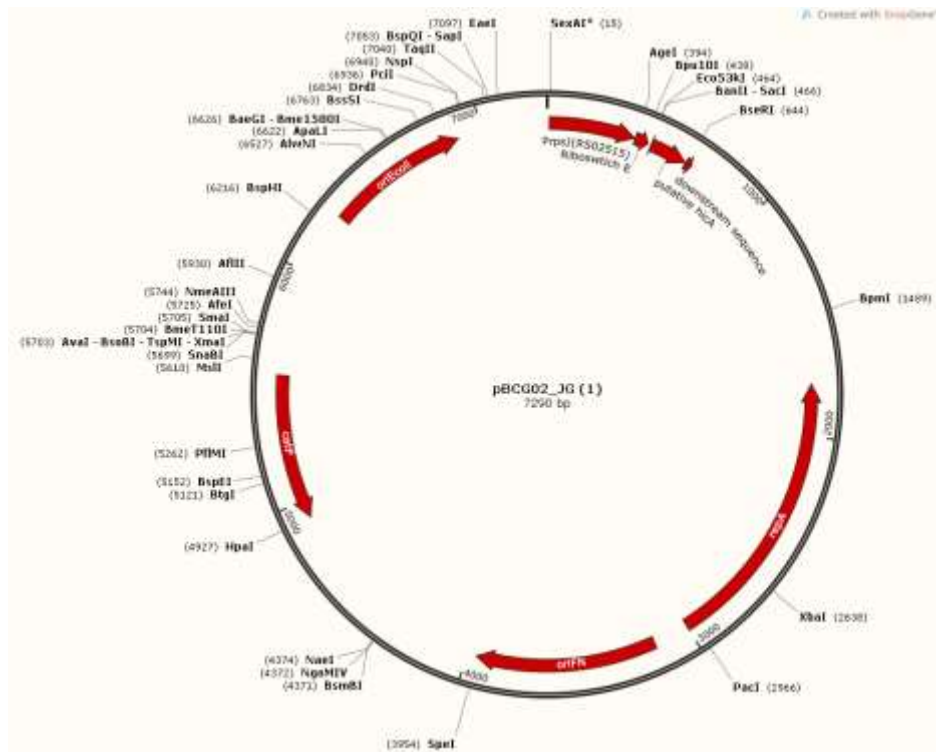
Como se observa en la **Figura 7**, los biofilms preformados presentaban resistencia a ampicilina en las tres cepas estudiadas. Sin embargo, se observó un efecto dosis dependiente en la erradicación de estos, tanto para (E)-trans-2-nonenal como para (E)-3-decen-2-one, donde (E)-trans-2-nonenal necesitó de concentraciones más bajas para eliminar el biofilm preformado.

El **posible efecto anti-biofilm de análogos de cinemaldehídos frente a biofilms mixtos *H. influenzae*-*F. nucleatum*** es un aspecto desconocido, que ha sido objeto de estudio en este Trabajo de Fin de Grado (**Objetivo 1**).

Por otra parte, el laboratorio receptor tiene experiencia en manipulación genética de *H. influenzae*, pero no de *F. nucleatum*. Existen herramientas genéticas para hacerlo, que el grupo receptor quiere implementar. En este trabajo, se han dado los primeros pasos en esta dirección. No se han obtenido resultados concluyentes, si bien se han hecho diseños y clonajes iniciales. Para la inactivación de genes de interés en *F. nucleatum* ATCC23726 (NCBI:txid525283), se utilizará el plásmido pBGC02 (**Figura 8**), para el clonaje de un *cassette* de disrupción del gen de interés (**Figura 9**). En este caso, y a modo de prueba de concepto, se ha diseñado un *cassette* para la disrupción del gen que codifica la ornitina descarboxilasa (ODC), cuyo localizador en NCBI es WP\_005903647.1. La ODC es una enzima clave

en el metabolismo de las poliaminas, que cataliza la conversión de ornitina en putrescina. En *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 23726, la ODC y las poliaminas juegan un papel importante en la formación de biopelículas, ayudando a la bacteria a adherirse a superficies y resistir frente a agentes antimicrobianos y a la respuesta inmune del huésped (NCBI, 2024) (Ling et al., 2024).

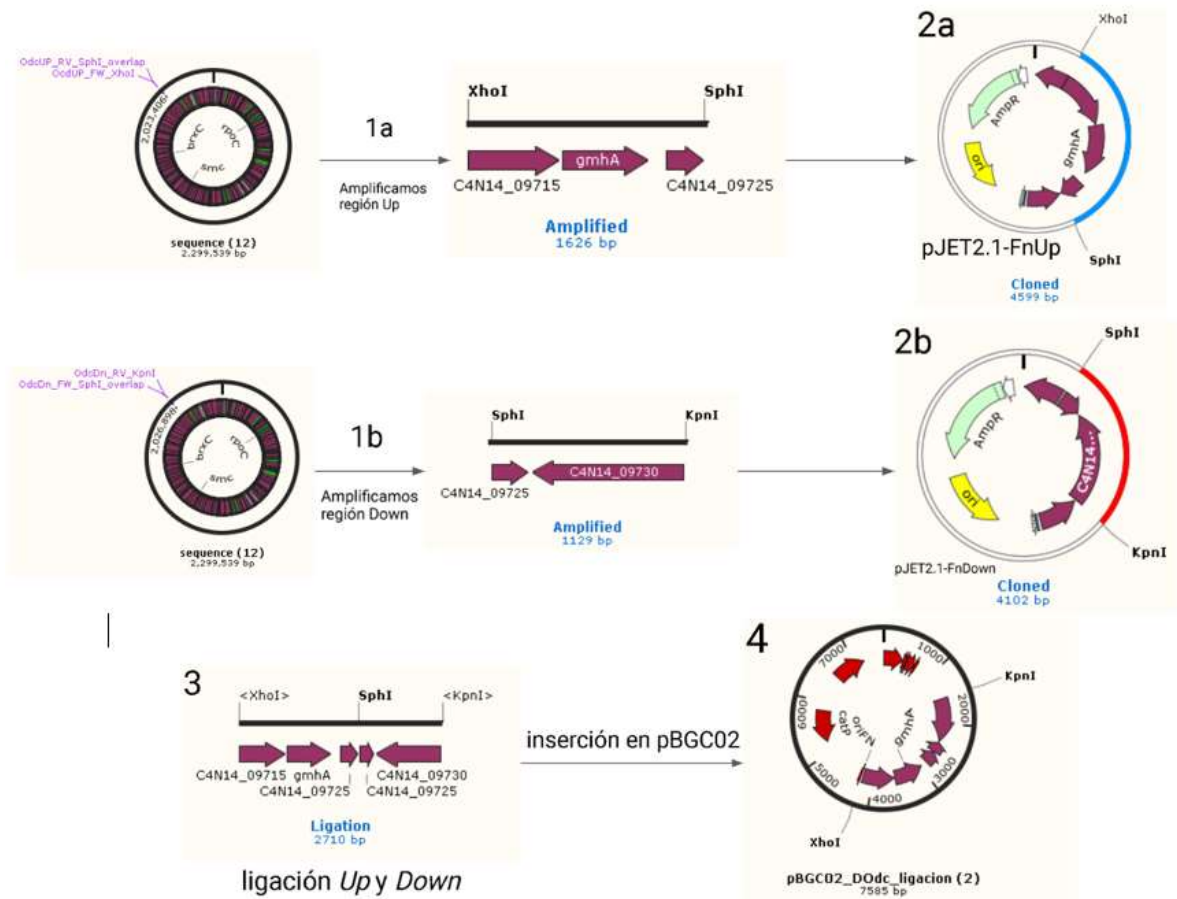
En este Trabajo de Fin de Grado **se ha diseñado un cassette para la disrupción del gen ornitina descarboxilasa de *F. nucleatum* ATCC 23726 (Objetivo 1).**



**Figura 8.** Plásmido pBGC02. Se trata de un plásmido de 7,290 pares de bases (pb), con origen de replicación en *Escherichia coli* (*E. coli*), y el gen *hicA*, un sistema toxina-antitoxina cuyo producto degrada el ARN mensajero, evitando la síntesis de proteínas y con ello la proliferación celular. Este gen se expresa a partir del promotor constitutivo *PrpsJ*, y su expresión está regulada por un riboswitch que responde a la presencia de teofilina en el medio. La teofilina se une al riboswitch provocando un cambio conformacional del ARN, permitiendo al ribosoma unirse al ARN mensajero y con ello la traducción del gen *hicA*. También contiene un origen de replicación para *F. nucleatum* y el gen de selección *catP* que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proporcionando resistencia al cloranfenicol. Se muestran dianas de varias enzimas de restricción. Imagen generada con la herramienta SnapGene.

Para la generación del *cassette*, se siguen una serie de pasos para introducir un inserto con las regiones amplificadas *Up* y *Down* en el plásmido pBGC02. Se comienza con la amplificación de las regiones flanqueantes al gen de la ornitina descarboxilasa, denominadas regiones *Up* y *Down*. Esto se consigue mediante los cebadores *OcdUp\_FW\_XhoI* y *OcdUp\_Rv\_SphI* para la región *Up* de 1.626 pb; y los cebadores *OcdDn\_FW\_SphI* y *OcdUp\_Rv\_KpnI* para generar la región *Down* de 1.129 pb (**Figura 9, 1a y 1b**). Estos fragmentos pueden seguir dos caminos. Por un lado, ser clonados en el plásmido pJET1.2 con un gen de selección de resistencia a ampicilina (**Figura 9, 2a y 2b**), y transformados en *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. Por otro lado, en el diseño de los cebadores *OcdUp\_Rv\_SphI* y *OcdDn\_FW\_SphI* se incluyó la diana de la enzima de restricción *SphI* para poder llevar a cabo la unión de ambos fragmentos *Up* y *Down* mediante una ligación linear entre ambos tras una digestión con la enzima (*SphI*) que nos permitiría obtener los extremos cohesivos compatibles correspondientes. El

resultado sería un fragmento *Up+Down* de 2.710 pb (**Figura 8**), que se clonará en pBGC02 para generar el *cassette* de interrupción del gen *diana* (**Figura 9**). En este Trabajo de Fin de Grado se logró avanzar hasta los pasos **2a** y **2b**.



**Figura 9.** **1a)** Amplificación de la región *Up* de 1.626 pb mediante los cebadores OcdUp\_FW\_XhoI y OcdUp\_Rv\_SphI. **1b)** Amplificación de la región *Down* de 1.129 pb mediante los cebadores OcdDn\_FW\_SphI y OcdUp\_Rv\_KpnI. **2a)** Clonaje de la región *Up* en el plásmido pJET2.1. **2b)** Clonaje de la región *Down* en el plásmido pJET2.1. **3)** Ligación de las regiones *Up* y *Down* a través de extremos cohesivos compatibles, cuyo producto tiene una longitud de 2.710 pb. **4)** Ligación de fragmento *Up+Down* en el plásmido pBGC02 para formar el cassette de interrupción.

Por último, el laboratorio receptor ha implementado protocolos de **co-cultivo de *S. pneumoniae-H. influenzae***. En este Trabajo de Fin de Grado, hemos analizado la **dinámica de este tipo de co-cultivo con aislados clínicos de *S. pneumoniae* pertenecientes a serotipo emergentes de relevancia clínica en el actual contexto vacunal VNC13 (Objetivo 2)**.

## 5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El (*E*)-*trans*-2-*nonenal* es un compuesto químico conocido por su capacidad para inhibir la formación de biofilms en diversas especies bacterianas. Los biofilms son estructuras complejas y resistentes que permiten a las bacterias sobrevivir en entornos hostiles, incluyendo la presencia de antibióticos y la respuesta inmune del huésped. Entre las especies bacterianas implicadas en la formación de biofilms en las vías respiratorias se encuentran *F. nucleatum* y *H. influenzae*, lo que puede complicar el tratamiento de infecciones respiratorias y exacerbar enfermedades crónicas como la EPOC. En este contexto, la **Hipótesis 1** de este Trabajo de Fin de Grado es “**El (*E*)-*trans*-2-*nonenal* inhibe la formación de biofilm mixtos derivados de co-cultivos de *F. nucleatum* y *H. influenzae*”**. Al impedir la formación de estas estructuras protectoras, se facilitaría la acción de los antibióticos y la respuesta inmune del huésped, mejorando así el manejo y tratamiento de las infecciones respiratorias.

Por otra parte, el co-cultivo de *S. pneumoniae* y *H. influenzae* influye en ambas especies participantes, si bien la información disponible no incluye cepas de *S. pneumoniae* pertenecientes a serotipos emergentes en el actual contexto de vacunación anti-neumocócica. Así la **Hipótesis 2** de este Trabajo de Fin de Grado es “**la dinámica del co-cultivo *S. pneumoniae*-*H. influenzae*, cuando las cepas del primero pertenecen a serotipos emergentes relevantes clínicamente, puede tener efecto sinérgico, antagónico o indiferente”**.

A partir de estas Hipótesis, se plantearon los siguientes **Objetivos específicos**:

**Objetivo 1. Evaluación del efecto del cinemaldehído (*E*)-*trans*-2-*nonenal* en la formación de biofilms mixtos *F. nucleatum*-*H. influenzae*.** Para ello, se ha llevado a cabo cuantificación de la viabilidad bacteriana en biofilms individuales y mixtos, en ausencia/presencia de un rango de concentraciones de (*E*)-*trans*-2-*nonenal*. De forma complementaria, se ha diseñado una herramienta genética para la inactivación del gen que codifica la ornitina decarboxilasa de *F. nucleatum* ATCC 23726.

**Objetivo 2. Análisis de los posibles efectos de *S. pneumoniae* serotipos 19A y 11A, en la viabilidad de diferentes cepas de *H. influenzae*.**

Para ello, se han crecido cultivos individuales y co-cultivos de *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, y se ha analizado la viabilidad de ambos.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas y medios de cultivo

Cepas de *H. influenzae* empleadas en este trabajo:

NTHi RdKW20. Cepa cuyo genoma completo ha sido secuenciado y anotado (NCBI Taxonomy ID: 71421). Su genoma codifica para 1.657 proteínas, incluyendo 429 proteínas hipotéticas (Shahbaaz et al., 2013). Primer organismo cuyo genoma completo fue secuenciado (National Human Genome Research Institute, 2013). Utilizada en los ensayos de análisis del efecto del (*E*)-trans-2-nonenal sobre biofilms formados por *H. influenzae* y *F. nucleatum*.

Aislados clínicos de pacientes EPOC, utilizadas en los ensayos de evaluación de co-cultivo con *S. pneumoniae*; cepas P595, P657, P676 y P621 (Gil-Campillo et al., 2023).

NTHi375. Cepa clínica aislado de otitis media (Hood et al., 1999), empleada en los ensayos de co-cultivo con *S. pneumoniae*.

NTHi R2866. Aislado clínico invasivo (Derek et al., 2007), empleada en los ensayos de co-cultivo con *S. pneumoniae*.

Cepas de *S. pneumoniae* empleadas en este trabajo:

Spn11A. Cepa cuyo serotipo capsular es emergente, no está presente en la vacuna PCV13 antineumocócica. Esta cepa es buena formadora de biofilm *in vitro* (Domenech et al., 2015). Utilizada en ensayos de co-cultivo con *H. influenzae*.

Spn19A. Cepa cuyo serotipo capsular es emergente, si bien sí está introducido en la vacuna conjugada neumocócica PCV13. Es uno de los serotipos que mayor resistencia a antibióticos presenta (Zhou et al., 2022). Utilizada en ensayos de co-cultivo con *H. influenzae*

*F. nucleatum* cepa ATCC25586, cuyo genoma completo ha sido secuenciado. Se utilizó en experimentos de inhibición de formación de biofilm con (*E*)-trans-2-nonenal.

Medios de cultivo utilizados:

1. Haemophilus Test Medium con agar, suplementado (sHTM-agar). Medio sólido utilizado para el crecimiento de colonias de *H. influenzae*, suplementado con hemina(10 mL/L) y  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido ( $\beta$ -NAD, 1 mL/L), siguiendo los requerimientos nutricionales de la especie bacteriana (Agrawal y Murphy, 2011). Preparación de HTM-agar Oxoid (Ref: CM0898B), 43 g HTM-agar/L agua miliRO, autoclavado, suplementación posterior, previa a preparación de placas.
2. Infusión cerebro corazón, Brain Heart Infusion suplementado (sBHI) para cultivos líquidos de *H. influenzae* y *F. nucleatum*. Preparación de BHI Oxoid (Ref: CM1135B), 37 g/L agua miliRO. Suplementado con las mismas proporciones de hemina y  $\beta$ -NAD que el medio sHTM-agar.
3. Agar-chocolate PolyViteX (PVX-agar), comercial (bioMérieux). Medio empleado para el crecimiento de cepas de *F. nucleatum* y *H. influenzae*.
4. Medio de cultivo líquido para neumococo CpH8 (pre-C), suplementado con extracto de levadura (4%) a una concentración final de 0.08% (C+Y); suplementado además con hemina y  $\beta$ -NAD en las mismas proporciones que sHTM para el crecimiento en co-cultivo con NTHi (sC+Y).

5. TSA-sangre para crecimiento de colonias de *S. pneumoniae* en medio sólido. Preparación de TSA-agar, 30g/L de Caldo Soja Trypticaseína (TSB, Condalab), agua miliRO, autoclavado, suplementación posterior, previa a preparación de placas con , sangre de oveja desfibrinada a una concentración final del 5%.
6. Luria Bertani (LB), utilizado para crecer *E. coli* Top. Cuando fue necesario, se suplementó con Ampicilina (100 µg/mL) o Cloranfenicol (20 µg/mL).

#### **4.2 Preparación de material para ensayo de evaluación de efecto anti-biofilm con (*E*)-trans-2-nonenal**

Inicialmente, fue necesaria la optimización del ensayo de análisis de efecto anti-biofilm de cinemaldehídos frente a biofilms mixtos *H. influenzae*-*F. nucleatum*, utilizando como punto de partida protocolos previamente establecidos para *H. influenzae*, crecido en aerobiosis. En este caso, el ensayo requiere anaerobiosis, así como condiciones adecuadas de inóculo de cada especie, y el establecimiento del rango de dosis de la droga a evaluar.

##### **Día 1. Crecimiento de cepas y preparación de medios.**

Se emplearon las cepas *H. influenzae* RdKW20 y *F. nucleatum* ATCC25586, preservadas a -80°C. *F. nucleatum* ATCC25586 fue crecida en PVX-agar, en anaerobiosis, a 37°C durante 24 h. RdKW20 fue crecida en PVX-agar, a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub> durante 16 h.

Medios: Preparación de sBHI líquido, sHTM-agar.

##### **Día 2. Setting del ensayo.**

Preparación de suspensiones bacterianas:

- *F. nucleatum* ATCC25586: a partir de la biomasa crecida en PVX-agar, preparamos una suspensión bacteriana a OD<sub>600</sub>=1, en 7 mL de sBHI. Posteriormente se realiza una dilución 1:5 en sBHI, que será nuestra suspensión de trabajo. Realizamos diluciones seriadas (1:10) en PBS y se plaquean las diluciones -4 y -5 en PVX-agar (control del inóculo inicial).

NTHi RdKW20: a partir de la biomasa crecida en PVX-agar, preparamos una suspensión bacteriana a OD<sub>600</sub>=0.1 en 7 mL de sBHI. Posteriormente se realiza una dilución (1:5) en sBHI, (que será nuestra suspensión de trabajo). Realizamos diluciones seriadas (1:10) en PBS, y se plaquean las diluciones -4 y -5 en HTMs-agar (control del inóculo inicial). Comparativamente, las suspensiones de ambas cepas son preparadas en ratio OD<sub>600</sub> 10:1, *F. nucleatum*-*H. influenzae*, si bien el ratio en cuanto a bacterias viables es 1:1.

Preparación de (*E*)-trans-2-nonenal sigma-Aldrich (REF: 255653). El compuesto puro es líquido, y su densidad es 0,846 g/mL. Se realiza una dilución del compuesto (1:100) en sBHI la cual es será empleada para preparar un stock de trabajo a una concentración de 800 µg/mL.

Empleamos placas estériles de 24 pocillos (24X), donde mezclamos volúmenes iguales de suspensión bacteriana y medio +/- (*E*)-trans-2-nonenal. Por tanto, el rango de concentraciones finales de droga a evaluar en la placa es 400/200/100/50/25/0 µg/mL. El ensayo se realiza por duplicado en placas 24X, donde una placa se empleará para estudiar el efecto inhibitorio de (*E*)-trans-2-nonenal a 24 h, la otra a 48 h. Empleamos 6 placas 24X por ensayo; dos para crecer cultivos individuales de *H. influenzae*, dos para crecer cultivos individuales de *F. nucleatum* y dos para crecer los co-cultivos..

Para iniciar los cultivos, añadimos 1 mL de (*E*)-trans-2-nonenal 800 µg/mL en el pocillo A1; en los pocillos A2→A6, añadimos 500 µL sBHI; a continuación, hacemos las diluciones 1:2 pasando 500 µL de A1 a A2, de A2 a A3, de A3 a A4, de A4 a A5.

Por último, añadimos 500 µL de suspensión bacteriana/pocillo; en el caso de monocultivos, añadimos 500 µL/pocillo de cada suspensión de trabajo (ver arriba) de la especie correspondiente; en el caso de co-cultivos, añadimos 250 µL de la suspensión de trabajo de cada especie para un volumen final de 500 µL/pocillo (**Figura 10C**). Las placas son incubadas en anaerobiosis, a 37°C, durante 24 o 48 h.

### Día 3. Análisis de efecto de (*E*)-trans-2-nonenal en formación de biofilm tras 24 h.

En todos los casos, cuantificamos la viabilidad de bacterias en fase planctónico (bacterias no adheridas) y en fase biofilm (bacterias adheridas):

(i) Bacterias en fase planctónica: tRecogemos el volumen de cada pocillo (1 mL) a un tubo tipo eppendorf de 1,5 mL correctamente rotulado (dilución 0). Realizamos diluciones seriadas 1:10 en PBS 1X (especificadas en **Tabla 1**), y plaqueamos 100 µL de cada dilución, RdKW20 en sHTM-agar, ATCC25586 en PVX-agar, co-cultivos, en ambos. Las placas fueron incubadas en anaerobiosis a 37°C durante 24 h (mono-cultivos *H. influenzae*) o 48 h (mono-cultivos *F. nucleatum* y co-cultivos).

Nota: para la cuantificación de metabolitos excretados al medio, centrifugamos todo el volumen del pocillo en un tubo eppendorf a 14.000 r.p.m., recogemos el sobrenadante en un nuevo tubo, y guardamos a -20°C.

(ii) Bacterias en fase biofilm: una vez retirado el volumen de cada pocillo, añadimos 1 mL sBHI/pocillo, y utilizamos una punta de pipeta de 1 mL para el rascado del biofilm que ha quedado adherido en el fondo del pocillo. Se realiza un rascado en todas las direcciones durante 30 s/pocillo. Posteriormente, recogemos todo el volumen en tubo tipo eppendorf de 1,5 mL, homogeneizando bien el contenido del pocillo. Realizamos diluciones seriadas 1:10 en PBS 1X (especificadas en **Tabla 1**), y plaqueamos 100 µL cada dilución, RdKW20 en sHTM-agar, ATCC25586 en PVX-agar, co-cultivos, en ambos. Las placas fueron incubadas en anaerobiosis a 37°C, durante 24 h (mono-cultivos *H. influenzae*) o 48 h (mono-cultivos *F. nucleatum* y co-cultivos).

( <i>E</i> )-trans-2-nonenal	400	200	100	50	25	0
RdKw20 (fase planctónica)	0/-1	0/-1	-1/-2/-3/ -4/ -5/-6	-1/-2/-3/ -4/ -5/-6	-4/-5/-6	-4/-5/-6
RdKw20 (fase biofilm)	0/-1/-2	0/-1/-2	-1/-2/-3/ -4/ -5/-6	-1/-2/-3/ -4/ -5/-6	-4/-5/-6	-5/-6/-7
ATCC25586 (fase planctónica)	0/-1	0/-1	0/-1/-2	0/-1/-2	-4/-5/-6	-5/-6
ATCC25586 (fase biofilm)	0/-1	0/-1	0/-1/-2	0/-1/-2	-4/-5/-6	-5/-6
Co-cultivo (fase planctónica)	0/-1/-2	0/-1/-2	-1/-2/-3/ -4/ -5/-6	-1/-2/-3/ -4/ -5/-6	-3/-4/-5/-6	-4/-5/-6
Co-cultivo (fase biofilm)	0/-1/-2	0/-1/-2	-1/-2/-3/ -4/ -5/-6	-1/-2/-3/ -4/ -5/-6	-3/-4/-5/-6	-4/-5/-6

**Tabla 1.** Diluciones plaqueadas según cepa, condición y concentración de (*E*)-trans-2-nonenal para mono- y co-cultivos de NTHi RdKw20 y *F. nucleatum* ATCC25586

#### **Día 4. Análisis de efecto de (*E*)-trans-2-nonenal en formación de biofilm tras 48 h.**

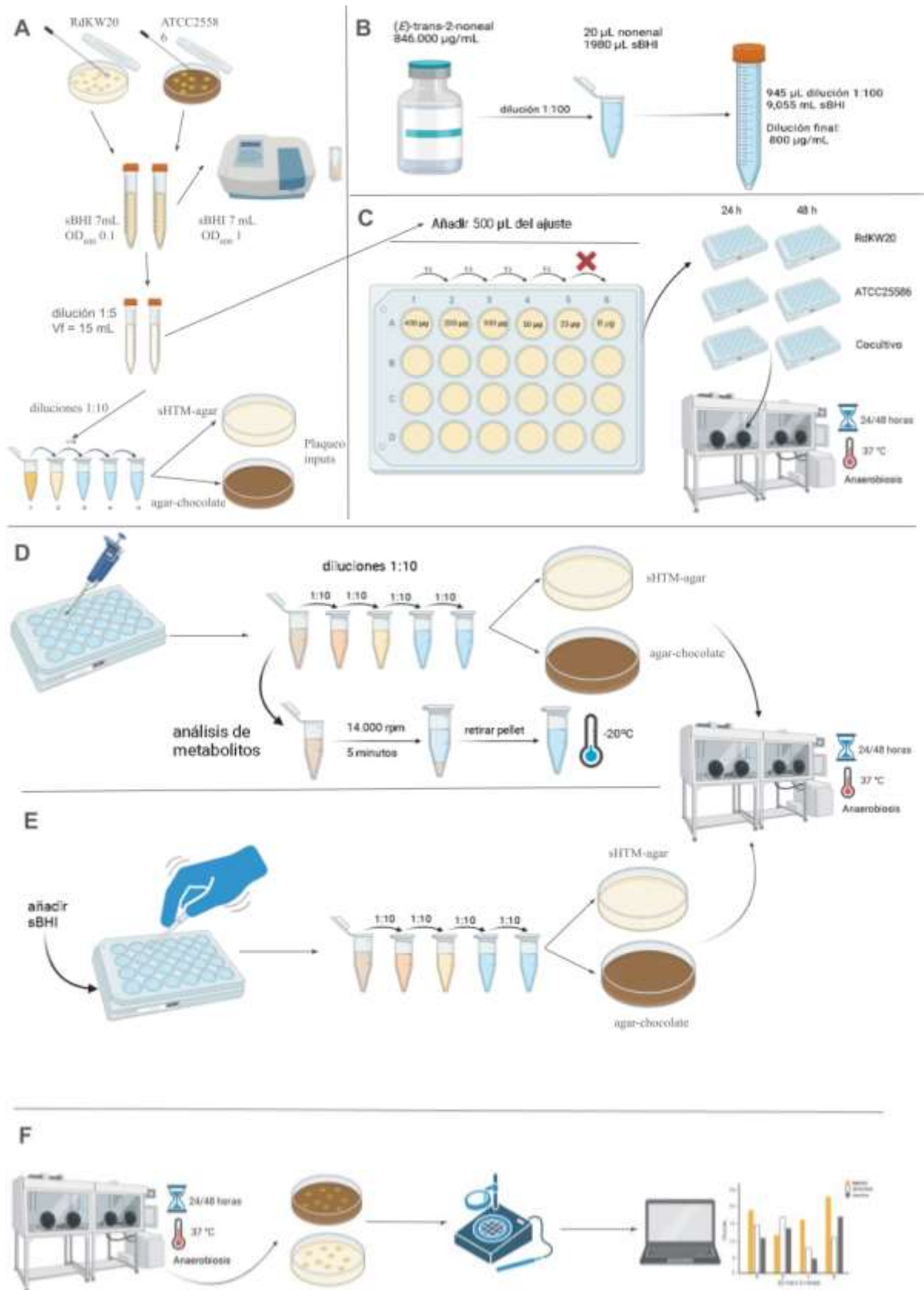
Realizamos el mismo protocolo que el Día 3 con las placas X24 que han sido incubadas durante 48 h.

#### **Día 5. Recuento de bacterias viables.**

Tras la incubación de las placas de PVX-agar y sHTM-agar, se realizan los recuentos de viables de cada especie bacteriana y cálculo de CFU/mL = CFU (en dilución X) / (factor de dilución x volumen plaqueado).

Se empleó el programa de GraphpadPrism(v.5) para el análisis estadístico y la representación gráfica de los resultados (**Figura 10F**).

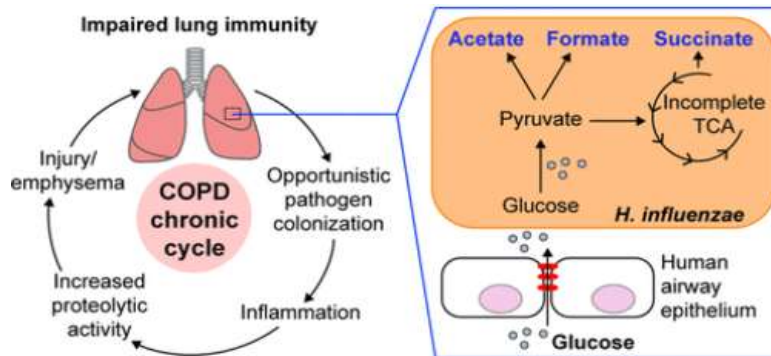




**Figura 10.** Diseño experimental para el análisis del efecto anti-biofilm de (*E*)-trans-2-nonenal. **A**) Preparación de las suspensiones bacterianas. **B**) Preparación de (*E*)-2-trans-nonenal. **C**) Elaboración del set de placas con las distintas concentraciones de (*E*)-2-trans-nonenal e incubación en anaerobiosis. **D**) Plaqueo de bacterias plantónicas y recogida de muestras para el análisis de excreción de metabolitos. **E**) Plaqueo de bacterias en fase biofilm. **F**) Recuento de bacterias viables y representación gráfica.

### 6.2.1 Análisis cuantitativo de metabolitos excretados

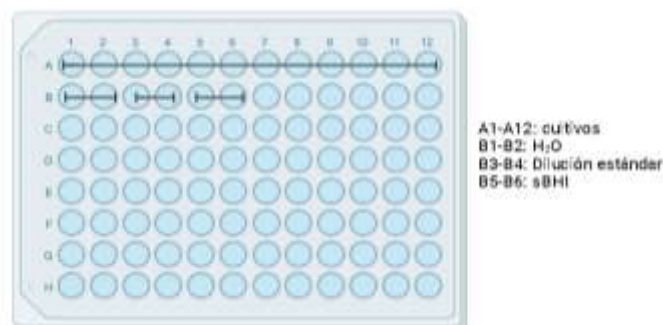
Se cuantificaron los niveles de excreción de los metabolitos ácido acético, ácido fórmico y ácido succínico en el sobrenadante de mono-cultivos y co-cultivos de *H. influenzae* y *F. nucleatum*. El ácido acético contribuye a la modulación de la respuesta inmune del huésped y ayuda a la persistencia de *H. influenzae* en las vías respiratorias. El ácido fórmico, aunque en menor cantidad, también es generado durante el metabolismo de glucosa a partir de piruvato. El ácido succínico es un intermediario del ciclo de Krebs (**Figura 11**), tomada de López-López et al. (2020).



**Figura 11.** Diagrama de la producción de ácido acético, fórmico y succínico a partir del catabolismo de la glucosa. (López-López et al., 2020). Adaptada de "*Haemophilus influenzae* glucose catabolism leading to production of the immunometabolite acetate has a key contribution to the host-airway-pathogen interplay," ACS Infectious Diseases, 6(3), 406-421. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00359>

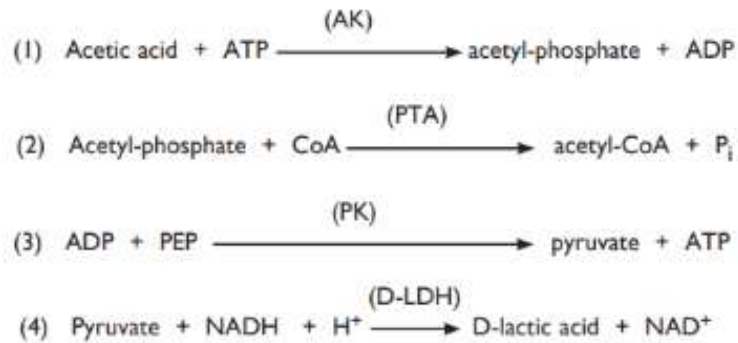
Se realizó la determinación colorimétrica mediante los kits de análisis K-ACETRM, K-FORM y K-SUCC (Megazyme). Estos protocolos determinan la concentración de metabolitos mediante la medida de la liberación de NAD<sup>+</sup>/NADH tras una reacción enzimática específica (**Figuras 13, 14, 15**). Esta detección a través de medidas de absorbancia a  $\lambda=340$  nm.

Para ello, en primer lugar, se descongelan en hielo los sobrenadantes previamente preservados a -20°C (ver **Figura 10D**). A modo de prueba de concepto, se analizaron sólo las muestras control crecidas en ausencia de (*E*)-2-trans-nonenal. Una vez descongeladas, las muestras se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 5 min, tras lo cual nos quedamos con los sobrenadantes. Los reactivos deben ser conservados a 4°C o -20°C según indicación del fabricante, por lo que deben mantenerse en hielo mientras se lleva a cabo el ensayo. En el caso del ácido acético, las muestras se diluyen 1:10 en sBHI para estar en rango de cuantificación, ya que es un metabolito producido en alta concentración. Estas determinaciones se realizan en placas de 96 pocillos (96X), tal y como aparece en la **Figura 12**.



**Figura 12.** Distribución de la placa durante el análisis de la excreción de metabolitos por cultivos de *H. influenzae* NTHi RdKW20, *F.nucleatum* ATCC25586 y los co-cultivos de ambas.

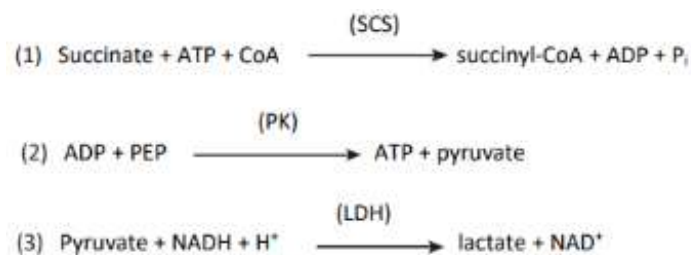
Cada metabolito tiene su respectivo protocolo específico y se realiza siguiendo las indicaciones del fabricante, ver **Figuras 13, 14 y 15**.



**Figura 13.** Reacciones enzimáticas en protocolo de cuantificación del ácido acético. El principio del ensayo es la conversión del ácido acético en acetil-fosfato y adenosina-5'-difosfato (ADP) mediante acetato quinasa (AK) en presencia de ATP (1). El acetil-fosfato se convierte rápidamente en acetil-CoA y fosfato inorgánico por la acción de la enzima fosfotransacetilasa (PTA) en presencia de CoA (2). El ADP se reconvierte en ATP y piruvato por acción de la enzima fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de piruvato quinasa (PK) (3), y el piruvato se reduce a D-lactato por la D-lactato deshidrogenasa (D-LDH), consumiendo NADH y produciendo NAD<sup>+</sup> (4). La concentración de la solución estándar para este ensayo es de 0,1 g/L (Megazyme, 2018).



**Figura 14.** Reacciones enzimáticas llevadas a cabo en protocolo de cuantificación del ácido fórmico mediante la reacción enzimática catalizada por formiato deshidrogenasa (FDH) en presencia de NAD<sup>+</sup>. En esta reacción, el ácido fórmico se oxida a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) con la formación de NADH (1). La cantidad de NADH formado es estequiométrica con la cantidad de ácido fórmico y se mide por el aumento de la absorbancia a λ=340 nm. Este método es específico para el ácido fórmico y no reacciona con otros ácidos orgánicos comunes. La concentración de la solución estándar para este ensayo es de 0,1 g/L (Megazyme, 2018).



**Figura 15.** Reacciones enzimáticas llevadas a cabo en protocolo de cuantificación del ácido succínico. En presencia de CoA, adenosina-5'-trifosfato (ATP) y ácido succínico (succinate), el ácido succínico se convierte en succinil-CoA por la enzima succinil-CoA sintetasa (SCS), con la formación de adenosina-5'-difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (Pi) (1). En el paso (2), el ADP reacciona en presencia de piruvato quinasa (PK) con fosfoenolpiruvato (PEP) para formar piruvato y ATP. Por último, el piruvato producido se reduce a lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de nicotinamida-adenina dinucleótido reducido (NADH), con la producción de NAD<sup>+</sup> (3). La concentración de la solución estándar para este ensayo es de 0,005 g/L (Megazyme, 2018).

Para el cálculo de la concentración de cada metabolito, determinamos la absorbancia de cada muestra a λ=OD<sub>340nm</sub> antes y después de añadir el último reactivo que provoca la generación del NAD<sup>+</sup>. La primera medida (antes) es puntual, mientras que para la segunda (después) se realiza de forma repetida (1/min durante 30 min), y utilizamos el último de los datos de absorbancia generados en ese lapso. A continuación, procedemos al cálculo de las concentraciones mediante la fórmula de la **Figura 16**. En el

caso del ácido acético, multiplicamos el valor resultante x10 debido al factor de dilución realizado al inicio del experimento. Como blanco, utilizamos los valores obtenidos de pocillos control con sBHI, que serán restados a los de las muestras para su representación gráfica.

$$c = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{acetic acid}} \quad [\text{g/L}]$$

**Figura 16.** Fórmula para el cálculo de las concentraciones de metabolitos excretados. c: Concentración del metabolito (g/L)  
V: Volumen final (mL). MW: Peso molecular del metabolito (g/mol).  $\Delta A$ : Cambio en la absorbancia ( $A_2 - A_1$ )  
 $\epsilon$ : Coeficiente de extinción de NADH a 340 nm (L/mol/cm). d: Trayectoria de la luz (cm)  
v: Volumen de la muestra (mL)

### 6.3 Análisis de la dinámica de cultivo y co-cultivos de *S. pneumoniae* y NTHi

Se emplearon cepas de neumococo de los serotipos emergentes Spn19A y Spn11A, y un panel de aislados clínicos de *H. influenzae* de distinto origen patológico (EPOC, otitis media y enfermedad invasiva). Este protocolo había sido puesto a punto por el grupo receptor a la realización de la realización de este Trabajo de Fin de Grado, y se aplicó a las cepas de interés.

1. Preparación de los stocks de trabajo de las cepas Spn11A y Spn19A: Descongelar ligeramente un stock disponible de cada cepa. Tomar 700  $\mu\text{L}$  para diluir en 14 mL de medio C+Y (dilución 1/20).
2. Crecer el cultivo a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  en estático hasta alcanzar  $\text{OD}_{600} = 0,5$ ; a esta absorbancia, el cultivo se encuentra en fase de crecimiento exponencial.
3. Diluir de nuevo el cultivo 1/20 en 14 mL de medio C+Y líquido.
4. Repetir paso 2.
5. Repartir en tubos tipo eppendorf, 1 mL del cultivo obtenido en el paso 4 con 200  $\mu\text{L}$  glicerol 80%; conservar a -80°C.

#### Preparación de stocks de trabajo de las cepas de NTHi:

##### **Día 1:**

Crecer las cepas de NTHi en PVX-agar-chocolate durante 9h. Inocular 2-3 colonias en 10 mL sBHI e incubar los cultivos a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  en agitación suave durante 12 h.

##### **Día 2:**

1. Diluir los cultivos previos en 20 mL sBHI ( $\text{OD}_{600} = 0,07$ )
2. Crecer los cultivos a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  en agitación hasta alcanzar  $\text{OD}_{600} = 0,5$ .
3. Repartir en tubos tipo eppendorf, 1 mL del cultivo obtenido con 200  $\mu\text{L}$  glicerol (80%) y conservar a -80°C.

#### 6.3.1 Cultivo individual y mixto de neumococo y NTHi en fase biofilm

**Paso 1. Preparación de los cultivos bacterianos a emplear como input del ensayo.** Trabajamos con las cepas *S. pneumoniae* Spn19A y Spn11A, *H. influenzae* R2866 y P621. Descongelamos alícuotas de los stocks de trabajo previamente generados, y centrifugamos 5 min a 14.000 r.p.m. Retiramos el sobrenadante, y resuspendemos cada pellet en 900  $\mu\text{L}$  sC+Y preparado fresco y atemperado. Realizamos las siguientes diluciones que van a ser plaqueadas:

- Spn19A, dilución 1:100
- Spn11A, dilución 1:100
- R2866, dilución 1:100
- P621, dilución 1:500

Estas diluciones se hacen en medio sC+Y para partir del mismo número de colonias para los 4 casos.

### **Paso 2. Setting del ensayo.**

Usamos placas 96X (Costar 3595). En el caso de los monocultivos, añadimos 100 µL sC+Y y 100 µL de la suspensión bacteriana correspondiente; para los co-cultivos, añadimos 100 µL de cada una de las dos suspensiones bacterianas. Los ensayos son realizados por duplicado; columnas 1→6, utilizadas para realizar recuento de bacterias viables; columnas 7→12, utilizadas para ensayo de tinción de biofilm con cristal violeta (**Figura 16B**). Una vez preparada, la placa se incuba a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en estático durante 6 h. Además, realizamos diluciones seriadas (1:10 en PBS 1X) de las suspensiones bacterianas y realizamos los plaques de las diluciones indicadas en la **Tabla 2 en los medios correspondientes para cada especie bacteriana.**

- **Paso 3. Plaqueo para determinación de viabilidad bacteriana.** (i) Bacterias en fase planctónica: Recogemos los sobrenadantes a tubo tipo eppendorf de 1,5 mL y hacemos diluciones seriadas 1:10 en PBS 1X indicadas en la **Tabla 2** para su plaqueo, en el caso de *S. pneumoniae* en TSA-sangre; en el caso de NTHi, en sHTM-agar.
- (ii) Bacterias en fase biofilm: una vez retirado el volumen de los pocillos en (i), añadimos 200 µL PBS 1X/pocillo. El biofilm se disgrega mecánicamente con una punta de pipeta de 100 µL. Con la misma punta con la que se realiza el rascado, tomamos 100 µL/pocillo para realizar las diluciones seriadas, según se indica en la **Tabla 2** y su posterior plaqueo.

Todas las placas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h.

Cepas	Spn19A	Spn11A	NTHi R2866	NTHi P621
Inputs	-6	-5	-6	-6
Diluciones 1:100 (Spn19A, 11A, R2866) 1:500 (P621)	-4	-4	-4	-4
Monocultivos (Fase Biofilm)	-6	-6	-6	-6
Co-cultivo (Fase plantónica)	-6	-6	-6	-5
Monocultivos (Fase Biofilm)	-4	-4	-5	-4
Co-cultivo (Fase plantónica)	-4	-4	-5	-5

**Tabla 2.** Diluciones plaqueadas para el recuento de CFUs/mL en ensayo de formación de biofilms individuales y mixtos Spn-NTHi.

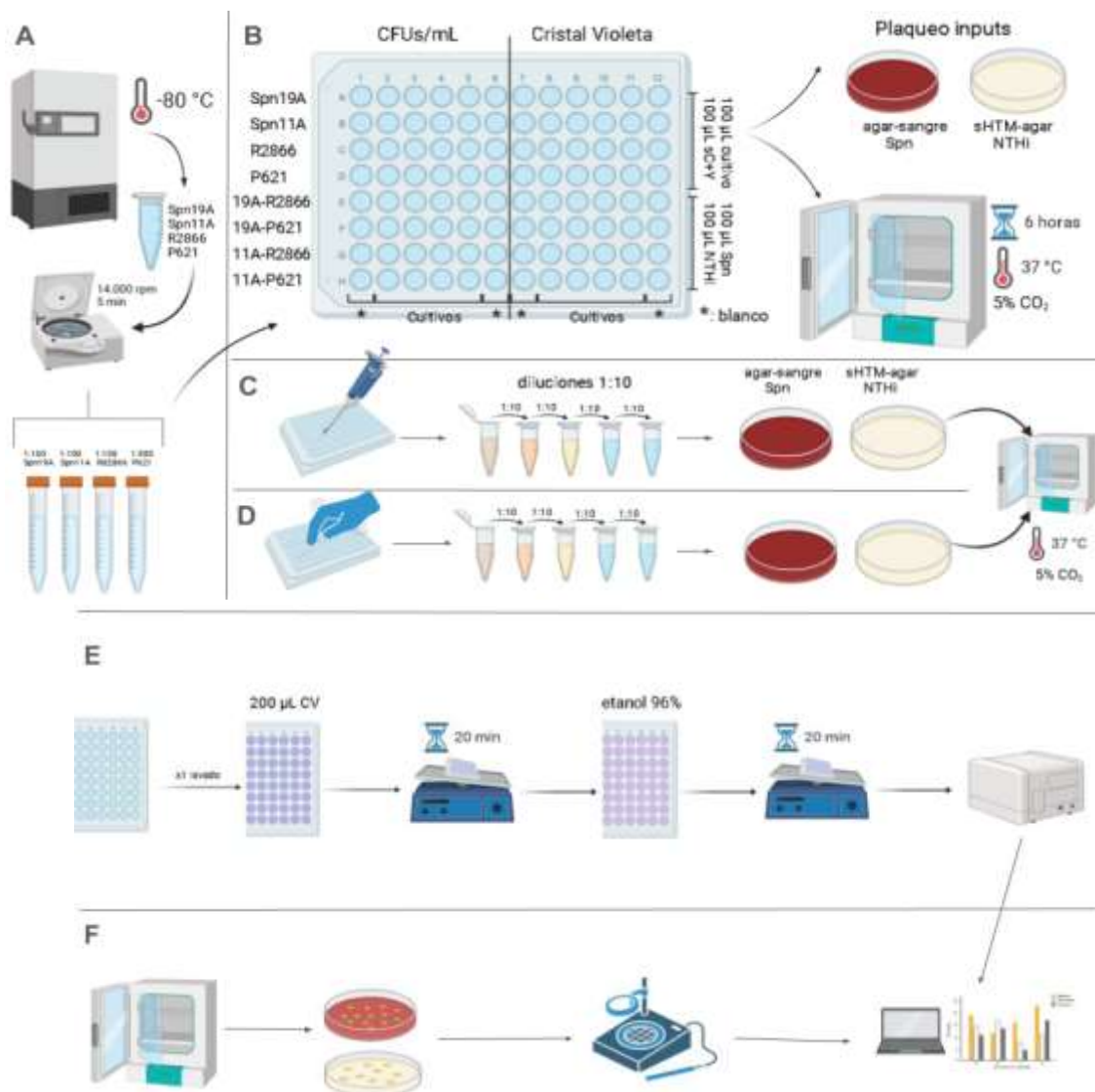


#### Paso 4. Tinción del biofilm bacteriano con cristal violeta.

En los pocillos correspondientes, retiramos el sobrenadante, añadimos 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta (0,5%) por pocillo, e incubamos durante 20 min a temperatura ambiente en agitación. A continuación, retiramos el cristal violeta, hacemos un lavado con 300  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$ , retiramos el  $\text{H}_2\text{O}$  y añadimos etanol 96% para disolver el biofilm mediante incubación durante 20 min en agitación a temperatura ambiente. Antes de la tinción con cristal violeta llevamos a cabo una medida turbidez de los cultivos (Absorbancia  $\lambda=595$  nm) (**Figura 17E**).

#### Paso 5. Recuento de las colonias y representación de los datos.

Tras la incubación durante la noche, las placas se sacan del incubador a la mañana siguiente para el recuento de colonias, el cálculo de las CFUs/mL, y la representación gráfica de los datos en GraphPad (**Figura 17F**).



**Figura 17.** Descripción de ensayo de mono- y co-cultivo Spn-NTHi en ensayo de tipo biofilm. **A)** Descongelación de stocks para la generación de cultivos input. **B)** Preparación de la placa. **C)** Plaqueo de bacterias en fase planctónica. **D)** Plaqueo de bacterias en fase biofilm. **E)** Tinción de biofilm bacteriano con cristal violeta. **F)** Análisis de los datos (recuento de bacterias viables y tinción de biofilm), análisis estadístico, y representación gráfica de resultados.

### 6.3.2 Cultivo individual y mixto de neumococo y NTHi en fase planctónica

Trabajamos con las cepas *S. pneumoniae* Spn19A y Spn11A, *H. influenzae* P595, P621, P657, P676, NTHi375 y R2866.

#### **Paso 1. Preparación de los cultivos**

Descongelamos los stocks de NTHi y centrifugamos durante 5 min a 14.000 r.p.m. Retiramos los sobrenadantes y resuspendemos los pellets en 900  $\mu$ L sBHI fresco atemperado/cultivo. Diluimos cada suspensión bacteriana 1:10 en 10 mL sBHI. De la misma forma, preparamos los cultivos de trabajo de Spn19A y Spn11A, utilizando sC+Y y dilución 1:20 en 15 mL de sC+Y. Los cultivos se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta OD<sub>600</sub> = 0,3 (Spn en estático, NTHi en agitación).

#### **Paso 2. Preparación de la placa de ensayo; plaqueo en t=0 h.**

A continuación, diluimos los cultivos 1:10 en sBHI (NTHi), y sC+Y para (*S. pneumoniae*), y empleamos, en placa X96: (i) en el caso de mono-cultivos, en un volumen final de 200  $\mu$ L/pocillo, 100  $\mu$ L de suspensión bacteriana + 100  $\mu$ L de medio sC+Y; (ii) en el caso de co-cultivos, añadimos 100  $\mu$ L de cada suspensión bacteriana. Las placas son incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en estático durante 6 h. A modo de control en este punto, realizamos diluciones seriadas y plaqueo de las suspensiones normalizadas a OD<sub>600</sub> = 0,3, así como las respectivas diluciones 1:10, según lo indicado en la **Tabla 3**. En el caso de *S. pneumoniae*, plaquaremos en TSA-sangre; en el caso de NTHi, emplearemos sHTM-agar.

#### **Paso 3. Plaqueo de mono- y co-cultivos.**

Transcurridas las 6 h de incubación, recogemos 100  $\mu$ L/pocillo, realizamos diluciones seriadas 1:10 en PBS 1X, plaquamos como se indica en la **Tabla 3**, en los medios sHTM-agar o TSA-sangre, como se indica previamente. Todas las placas son incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en durante 24 h. Posteriormente, realizamos el recuento de colonias, cálculo de CFU/mL, análisis estadístico y representación gráfica de los resultados obtenidos.

Cepas →	Spn19A	Spn11A	P595	P621	P657	P676
OD <sub>600</sub> = 0,3	-5	-5	-6	-6	-6	-6
Dilución 1:10	-4	-4	-5	-5	-5	-5
t = 0 horas monocultivo	-4	-4	-5	-5	-5	-5
t = 0 horas co-cultivo	-4	-4	-5	-5	-5	-5
t = 6 horas monocultivo	-5	-5	-6	-6	-6	-6
t = 6 horas co-cultivo	-6	-6	-6	-6	-6	-6

**Tabla 3.** Diluciones plaqueadas en ensayos de mono- y co-cultivo Spn-NTHi, en fase planctónica.

## 6.4 Manipulación del plásmido pBGC02 para generación de mutantes en *F. nucleatum* ATCC23726.

Se ha diseñado una estrategia para el uso del plásmido pBGC02 (**Figura 8**) para la inserción de una *cassette* de disrupción dirigido al gen que codifica una ornitina descarboxilasa. A fecha de entrega del TFG, los avances de esta parte del trabajo han sido limitados, y están descritos a continuación.

En primer lugar, generamos bacterias quimiocompetentes de la cepa *E. coli* Top10 para transformación de pBGC02.

**Día 1:** Crecimiento de *E. coli* Top10 desde stock a -80°C en LB-agar, a 37°C durante 24 h.

**Día 2:** Preparación y autoclavado del material a utilizar:

- 200 mL LB. Conservar a 4°C.
- Soluciones: 50 mL MgCl<sub>2</sub> 0,1 M, 25 mL CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, 5 mL CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, 15% glicerol. Conservar a 4°C.
- Un matraz de 100 mL para pre-inóculo; un matraz de 500 mL para cultivo.

Inoculamos biomasa de la placa de Día 1 en 5 mL LB, durante 16 h a 37°C.

**Día 3:** A continuación, diluimos el cultivo en 100 mL LB atemperado a OD<sub>600</sub>=0,05, y crece a 37°C con agitación hasta OD<sub>600</sub>=0.35-0.4 (inicio de la fase exponencial de crecimiento). En ese momento, repartimos rápidamente el cultivo completo en 2 tubos tipo falcon estériles, pre-enfriados, para frenar el crecimiento bacteriano en hielo durante 30 min. Simultáneamente, enfriamos las soluciones previamente preparadas (Día 2) en hielo. A continuación, centrifugamos los cultivos a 4°C, 4.000 r.p.m., durante 15 min para obtener los pellets correspondientes, que son resuspendidos con pipeta con 25 mL MgCl<sub>2</sub> 0,1 M pre-enfriado en hielo (1/2 volumen inicial por tubo). Trabajar en hielo.

A continuación, centrifugamos a 4°C, 4.000 r.p.m. y durante 15 min, decantamos el sobrenadante, y resuspendemos los pellets con pipeta en 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1M por falcon, enfriado en hielo. Trabajar en hielo. Centrifugamos a 4°C, 4.000 r.p.m., 15 min, decantamos los sobrenadantes y resuspendemos ambos pellets en un volumen total de 5 mL CaCl<sub>2</sub> 0,1M con 15% glicerol en hielo. Dispensamos alícuotas de 200 µL en tubos tipo eppendorf de 1,5 mL enfriados a -80°C, que congelamos rápidamente en nitrógeno líquido y preservamos a -80°C.

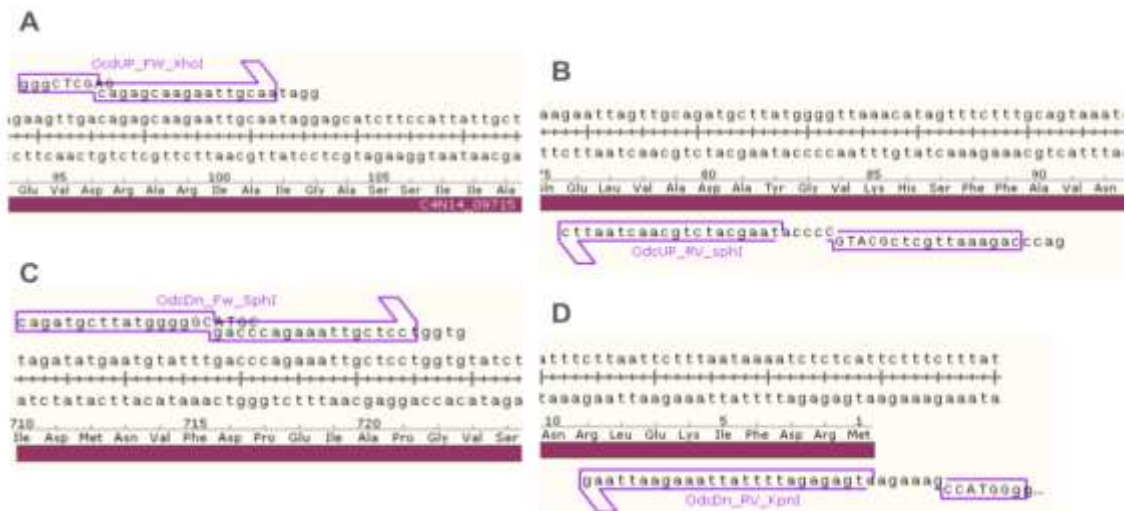
Una vez disponemos de bacterias quimiocompetentes, utilizamos una alícuota para transformación con pBGC02 y selección de transformantes en LB-agar con cloranfenicol 20 µg/mL tras incubación a 37°C durante 24 h. A continuación, re-aislamos un clon transformante en LB-agar con cloranfenicol 20 µg/mL para extracción y purificación de pBGC02.

### **Amplificación regiones Up y Down:**

Para generar el *cassette* de disrupción del gen que codifica una ornitina decarboxilasa, amplificamos las regiones flanqueantes a este gen en el genoma de *F. nucleatum* ATCC23726, regiones *Up* y *Down*. Para ello, realizamos una PCR con polimerasa de alta fidelidad *Phusion* (Thermo Fisher Scientific F-530L) usando ADN genómico purificado de la cepa *F. nucleatum* ATCC23726 como molde, y los siguientes cebadores.:

- Cebadores para amplificación de región Up: OcdUp\_FW\_XhoI (**Figura 18A**) y OcdUp\_Rv\_SphI (**Figura 18B**).
- Cebadores para amplificación de región Down: OcdDn\_FW\_SphI (**Figura 18C**) y OcdUp\_Rv\_KpnI (**Figura 18D**).





**Figura 18.** Sitios de reconocimiento de cebadores en el genoma de *F. nucleatum* utilizados para amplificar los fragmentos *Up*, 1,626 pb (A y B) y *Down*, 1,129 pb (C y D) del *cassette* de disrupción del gen que codifica la ornitina decarboxilasa.

#### Mix PCR:

- Buffer (5X): 10  $\mu$ L
- dNTPs (10 mM): 1  $\mu$ L
- $MgCl_2$ : 1  $\mu$ L
- DMSO: 1  $\mu$ L
- Oligos (10 mM): 1  $\mu$ L
- Enzima *Phusion*: 0,2  $\mu$ L
- $H_2O$ : 33,8  $\mu$ L
- DNA: 1  $\mu$ L
- Volumen total / reacción: 49  $\mu$ L

#### Programa PCR:

- 98°C 30 s
- X24 ciclos: 98°C 10 s / 58°C 30 s / 72°C 30 s
- 72°C 5 min
- 4°C indefinido

El producto se conserva a -20°C.

A continuación, comprobamos que la reacción de amplificación ha sido efectiva mediante electroforesis en gel de agarosa 1% con agente intercalante de ADN Midori Green (20  $\mu$ L de una dilución 1:10) y marcador de peso molecular 1 Kb. Para la electroforesis, se aplica un voltaje de 100V, y el resultado se visualiza en un equipo ChemiDoc (Biorad).

**Purificación de amplicones:** a continuación, realizamos la purificación de los amplicones *Up* and *Down*, cortando banda de gel, mediante el kit “Gel and PCR Clean-up NucleoSpin” (MACHEREY-NAGEL), siguiendo las indicaciones del fabricante.

**Clonaje de amplicones *Up* y *Down* purificados en vector pJET1.2 (Figura 9):** Mix de ligación, independiente para amplicón *Up* y *Down*:

- Buffer ligasa: 4 µL
- Vector pJET2.1: 0,5 µL
- Inserto Up / Inserto Down: 1,5 µL
- DNA T4 ligasa: 1 µL
- H<sub>2</sub>O: 13 µL
- Volumen total / reacción: 20 µL

El producto de esta ligación es conservado a -20°C.

El producto de ligación fue transformado en *E. coli* TOP10 quimiocompetentes, y los clones transformantes fueron seleccionados en LB-agar con ampicilina 100 µg/mL. A continuación, se aislaron clones en nuevas placas de LB-agar con ampicilina, y se analizó la inserción del fragmento *Up* o *Down* mediante PCR con los pares de cebadores empleados previamente, i.e. fragmento *Up*, cebadores OcdUp\_FW\_XhoI y OcdUp\_Rv\_SphI; fragmento *Down*, cebadores OcdDn\_FW\_SphI y OcdUp\_Rv\_KpnI, utilizando como molde biomasa de los clones aislados. La selección de clones no resultó positiva en ninguno de los dos casos (pJET2.1-FnUp o pJET2.1-FnDown).

**PCR inversa utilizando como molde pBGC02 para generación de vector receptor de cassette de disrupción Up+Down:** utilizamos pBGC02 como molde para realizar una PCR inversa con los cebadores pBGC02\_FW\_HindIII y pBGC02\_RV\_SalI, con el objetivo de linealizar este plásmido eliminando a su vez las regiones repA y pcwu6-R. Este producto de PCR inversa de 4.839 pb servirá como vector para el posterior clonaje del producto de ligación de las regiones *Up+Down*. Esta PCR se realizó con la polimerasa de alta fidelidad *Phanta* ThermoFisher (EP0401).

Mix PCR inversa:

- Mix *Phanta*: 12,5 µL
- Oligos (10mM): 0,1 µL cada uno
- H<sub>2</sub>O: 11,8 µL
- DNA molde, pBGC02: 0,5 µL

Volumen total / reacción: 25 µL

Protocolo PCR inversa:

- 95°C, 3 min
- x30 ciclos: 15seg, 95°C; 58°C, 15 seg; 72°C, 5 min
- 72°C, 5 min
- 4°C, indefinido

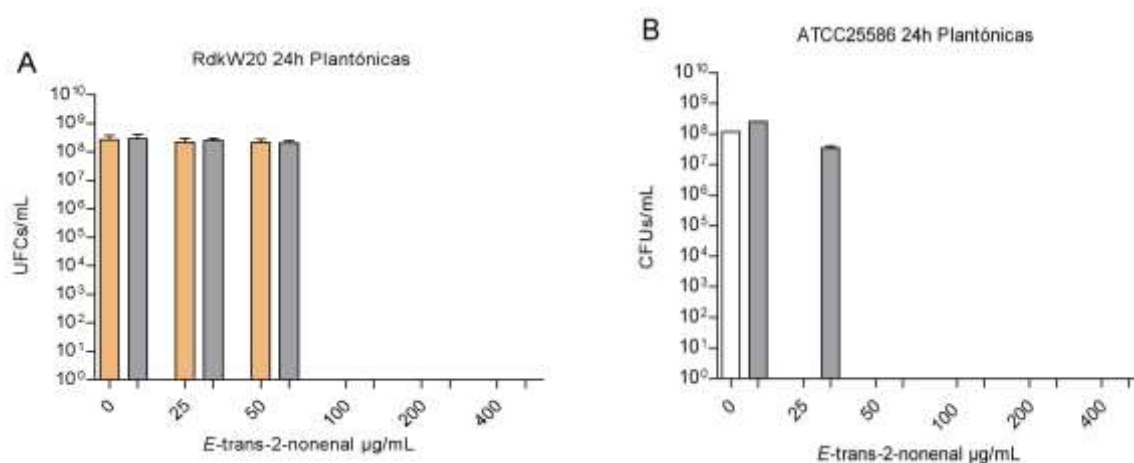
El producto de amplificación se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% como se indica previamente.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis del efecto de (E)-trans-2-nonenal en la formación de biofilms de *H. influenzae* y *F. nucleatum*.

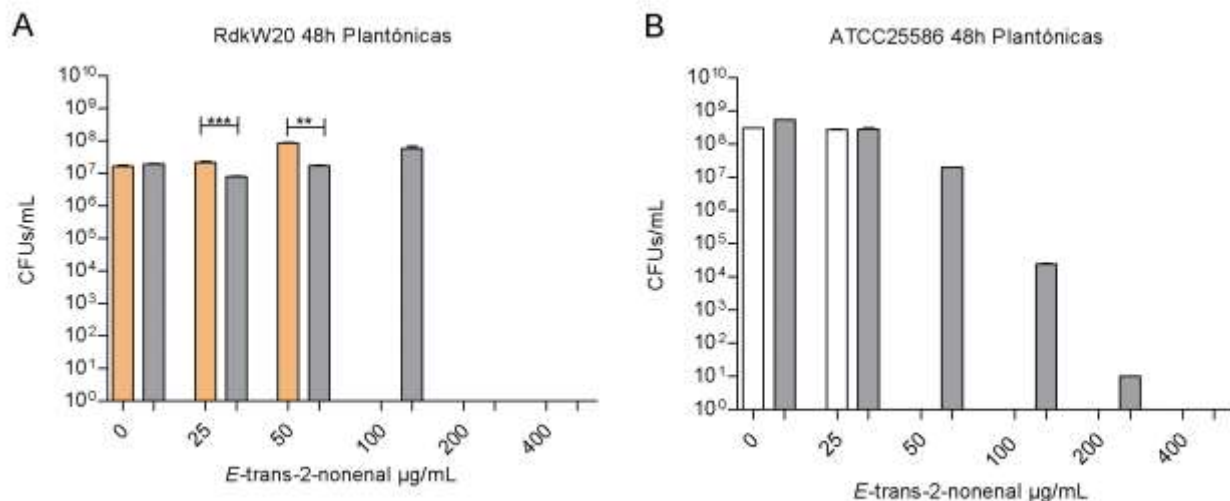
Tal y como se indica en la sección de métodos, determinamos el efecto de un rango de concentraciones del análogo de cinemaldehído (*E*)-trans-2-nonenal entre 0 y 400  $\mu\text{g/mL}$  en la capacidad de formación de biofilm de las cepas *H. influenzae* RdKW20 y *F. nucleatum* ATCC25586, en mono- y co-cultivo. Para ello, se realizó recuento de bacterias viables (CFU/mL) en sBHI, en sobrenadante y adheridas a la superficie abiótica del fondo de pocillos de placas X24, tras 24 y 48 h de incubación en anaerobiosis a 37°C. El uso en paralelo de sHTM-agar (crecimiento de *H. influenzae*) y PVX-agar (crecimiento de *H. influenzae* y *F. nucleatum*) permite determinar la proporción relativa de cada especie en co-cultivos. Los datos se representan en diagrama de barras, diferenciando entre especies bacterianas, duración del ensayo, cuantificación de bacterias en suspensión/planctónicas o formadoras de biofilm. El análisis estadístico de datos se realizó mediante t-Test no paramétrico.

#### 7.1.1 Efecto de (E)-trans-2-nonenal en la viabilidad de bacterias en suspensión/fase planctónica.



**Figura 19.** Recuento de bacterias viables en fase planctónica tras ensayo de 24 h, de **A)** cepa *H. influenzae* RdKW20 en mono-cultivo (barras naranjas) o en co-cultivo con *F. nucleatum* ATCC25586 (barras grises); **B)** *F. nucleatum* ATCC25586 en mono-cultivo (barras blancas) o en co-cultivo con *H. influenzae* RdKW20 (barras grises). El eje X representa la concentración creciente de (E)-trans-2-nonenal; el eje Y el número de bacterias viables como CFUs/mL. Los datos están representados mediante un gráfico de barras con su correspondiente desviación estándar. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante t-student no paramétrico.

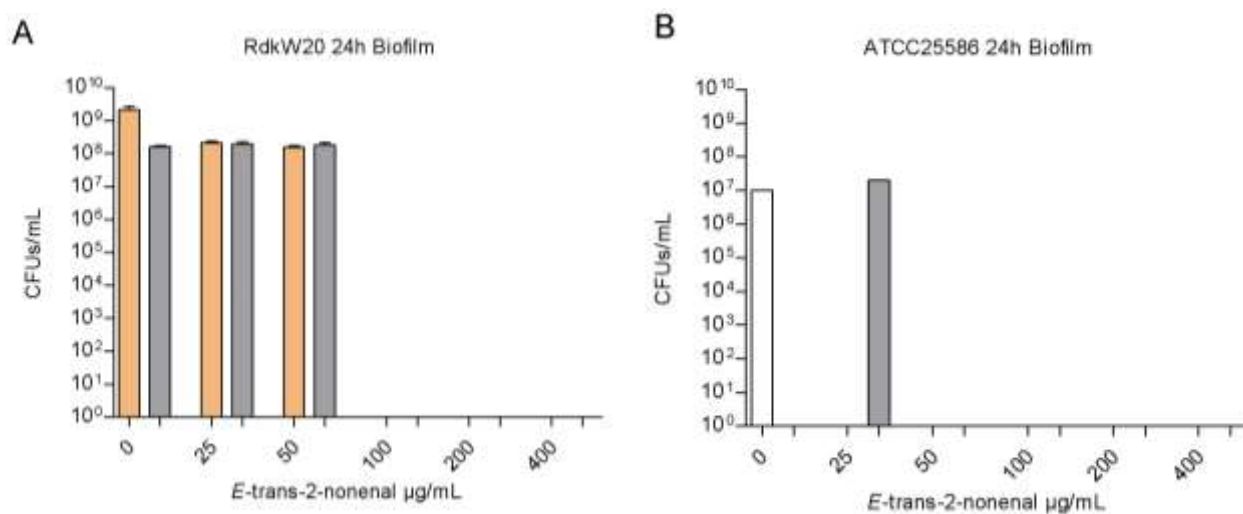
Tal y como muestra la **Figura 19**, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de *H. influenzae* en mono- o co-cultivos a 24 h, si bien se observó un claro efecto antimicrobiano de cinemaldehído a concentraciones  $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ . En el caso de *F. nucleatum*, se observó un aumento de la viabilidad bacteriana en la condición de co-cultivo.



**Figura 20.** Recuento de bacterias viables en fase planctónica tras ensayo de 48 h, de **A**) cepa *H. influenzae* RdKW20 en monocultivo (barras naranjas) o en co-cultivo con *F. nucleatum* ATCC25586 (barras grises); **B**) *F. nucleatum* ATCC25586 en monocultivo (barras blancas) o en co-cultivo con *H. influenzae* RdKW20 (barras grises). El eje X representa la concentración creciente de (E)-trans-2-nonenal; el eje Y el número de bacterias viables (CFUs/mL). Los datos están representados mediante un gráfico de barras con su correspondiente desviación estándar. El análisis estadístico de datos se realizó mediante T-student no paramétrico.

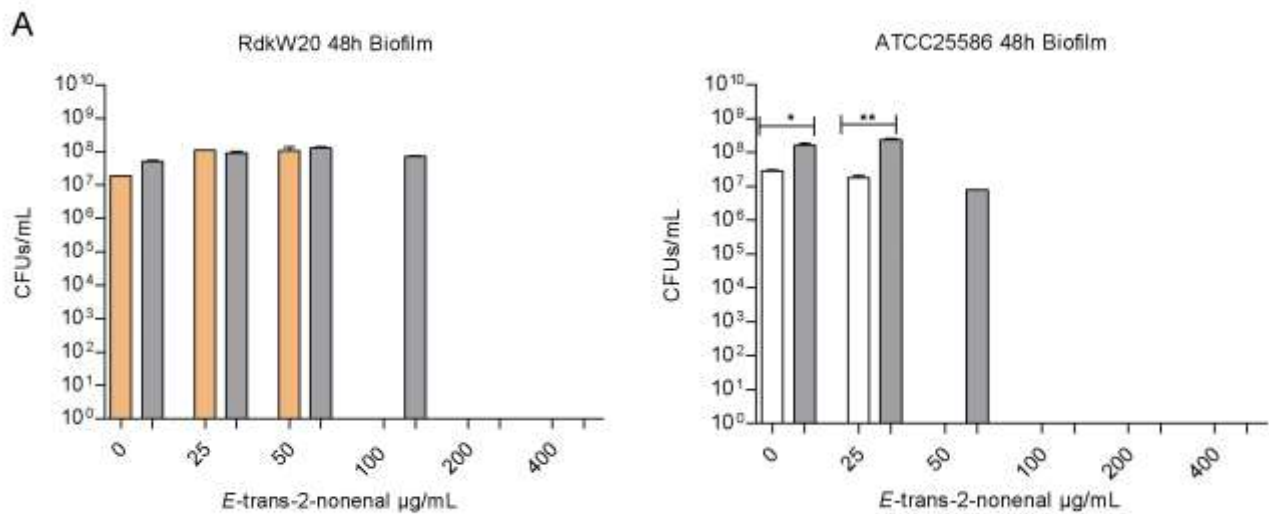
Tal y como muestra la **Figura 20**, el co-cultivo aumentó la supervivencia tanto de *H. influenzae* (**A**) como de *F. nucleatum* (**B**) tras 48 h de incubación; en el caso de *H. influenzae*, la concentración mínima inhibitoria (CMI) pasó de 100 µg/mL a 200 µg/mL; en el caso de *F. nucleatum*, la CMI pasó de 50 µg/mL a 400 µg/mL.

### 7.1.2 Efecto de (E)-trans-2-nonenal en la viabilidad bacteriana en fase biofilm.



**Figura 21.** Recuento de bacterias viables en fase biofilm tras ensayo de 24 h, de **A**) cepa *H. influenzae* RdKW20 en monocultivo (barras naranjas) o en co-cultivo con *F. nucleatum* ATCC25586 (barras grises); **B**) *F. nucleatum* ATCC25586 en monocultivo (barras blancas) o en co-cultivo con *H. influenzae* RdKW20 (barras grises). El eje X representa la concentración creciente de (E)-trans-2-nonenal; el eje Y el número de viables en CFUs/mL. Los datos están representados mediante un gráfico de barras con su correspondiente desviación estándar. El análisis estadístico de datos se realizó mediante T-student no paramétrico.

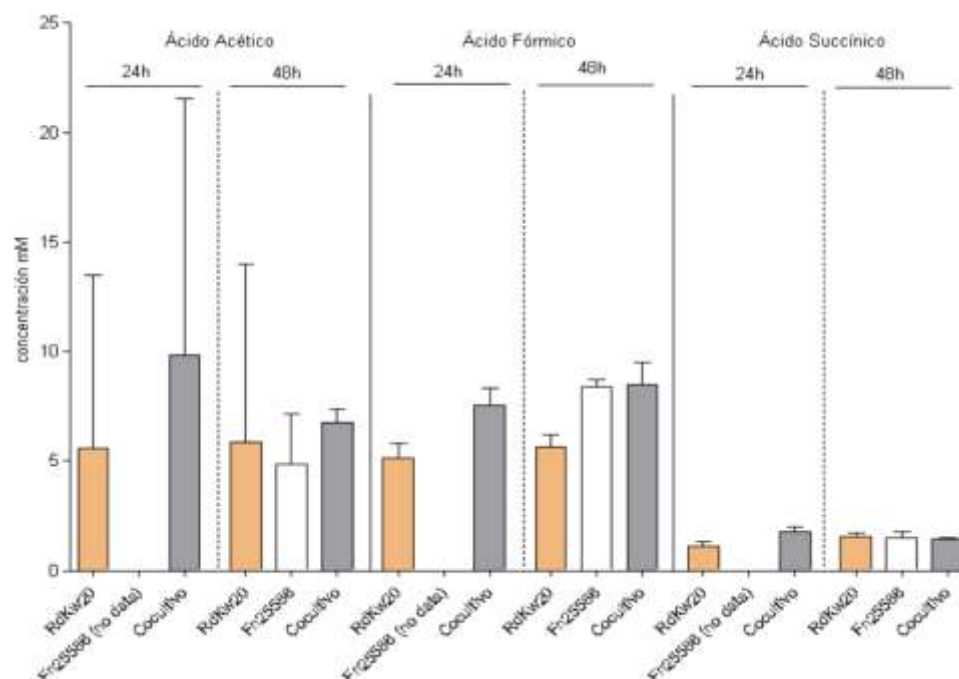
Tal y como muestra la **Figura 21**, no se observaron diferencias significativas en la viabilidad de *H. influenzae* en mono- o co-cultivos a 24 h, si bien se observó un claro efecto antimicrobiano de cinemaldehído a concentraciones  $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ . En el caso de *F. nucleatum* obtuvimos recuento de colonias únicamente en ausencia de tratamiento, mientras que en co-cultivo la CMI aumentó hasta  $50 \mu\text{g/mL}$ .



**Figura 22.** Recuento de bacterias viables en fase biofilm tras ensayo de 48 h, de **A)** cepa *H. influenzae* RdKW20 en monocultivo (barras naranjas) o en co-cultivo con *F. nucleatum* ATCC25586 (barras grises); **B)** *F. nucleatum* ATCC25586 en monocultivo (barras blancas) o en co-cultivo con *H. influenzae* RdKW20 (barras grises). El eje X representa la concentración creciente de (E)-trans-2-nonenal; el eje Y el número de bacteria viables (CFUs/mL). Los datos están representados mediante un gráfico de barras con su correspondiente desviación estándar. El análisis estadístico de datos se realizó mediante T-student no paramétrico.

Tal y como muestra la **Figura 22**, el co-cultivo aumentó la supervivencia tanto de *H. influenzae* (**A**) como de *F. nucleatum* (**B**) en fase biofilm tras 48 h de incubación; en el caso de *H. influenzae*, la CMI pasó de  $100 \mu\text{g/mL}$  a  $200 \mu\text{g/mL}$ ; en el caso de *F. nucleatum*, la CMI pasó de  $50 \mu\text{g/mL}$  a  $100 \mu\text{g/mL}$ .

### 7.1.3 Cuantificación de metabolitos excretados en mono- y co-cultivos *H. influenzae*-*F. nucleatum*



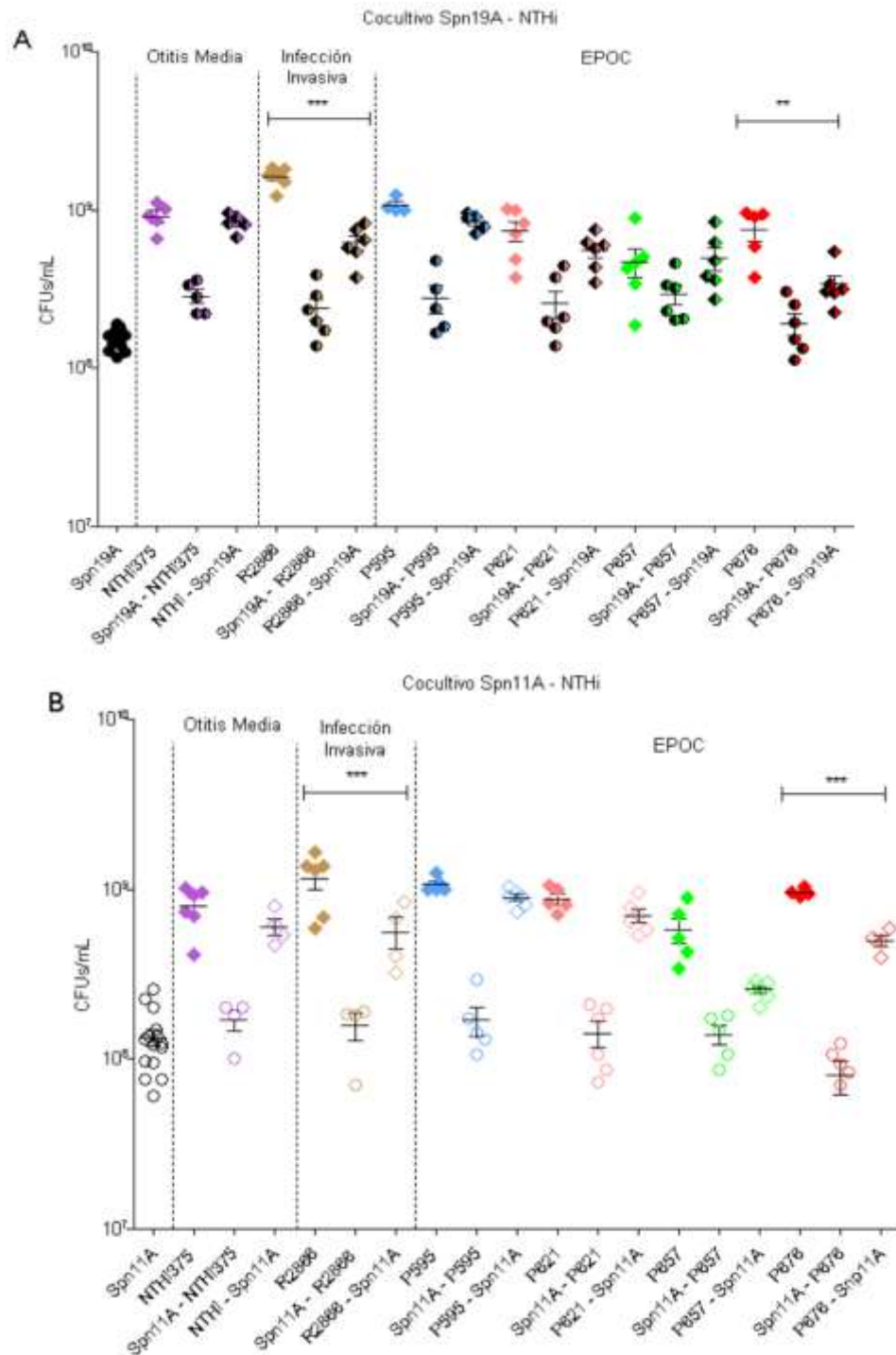
**Figura 23.** Cuantificación de los niveles de ácido acético, fórmico y succínico excretados al medio por monocultivos de *H. influenzae* RdKW20 (naranja), *F. nucleatum* ATCC25586 (blanco), y co-cultivo (gris) de ambas, crecidos en sBHI. Debido tanto a la elevada dispersión de los datos, como al limitado número de datos (disponíamos de una sola réplica técnica), no se realizó análisis estadístico en este apartado.

Este análisis de metabolitos excretados debe considerarse preliminar, con dispersión en los datos, falta de algunos datos por problemas técnicos, y necesidad de réplicas técnicas y biológicas que no han sido realizadas debido a problemas técnicos con la cabina de anaerobiosis necesaria para crecer estos mono- y co-cultivos. De forma preliminar, concluimos que la cantidad excretada de ácido acético es independiente del tipo y tiempo de cultivo. En el caso del ácido fórmico, observamos una tendencia del co-cultivo a mayor excreción a 24 h, y del mono-cultivo de *F. nucleatum* y el co-cultivo a mayor excreción a 48 h. Por último, el ácido succínico es el metabolito excretado en menor cuantía, sin diferencias apreciables entre cultivos ni tiempos (**Figura 23**).

### 7.2 Análisis de la dinámica de co-cultivo entre *H. influenzae* y serotipos emergentes de *S pneumoniae*.

Se emplearon cepas de *S. pneumoniae* de los serotipos emergentes Spn19A y Spn11A, y las cepas NTHi P595, P621, P657 y P676 (aislados de muestras respiratorias de pacientes con EPOC), 375 (aislado de otitis media) y R2866 (aislado invasivo), para analizar la dinámica del mono- y co-cultivos en fase planctónica (ver **Figura 24**). El estudio de la dinámica del mono- y co-cultivos en fase biofilm, se emplearon cepas de *S. pneumoniae* de los serotipos Spn19A y Spn11A, y las cepas NTHi R2866 y P621, seleccionadas estas últimas por su diferente capacidad de formación de biofilm, alta y baja respectivamente (**Figura 25**). En todos los casos, los cultivos se crecieron durante 6 h, tiempo tras el cual fueron plaqueados para su posterior recuento de bacterias viables y análisis.

**7.2.1 Análisis de la dinámica de co-cultivo *H. influenzae*-serotipos emergentes de *S. pneumoniae*, en fase planctónica.**



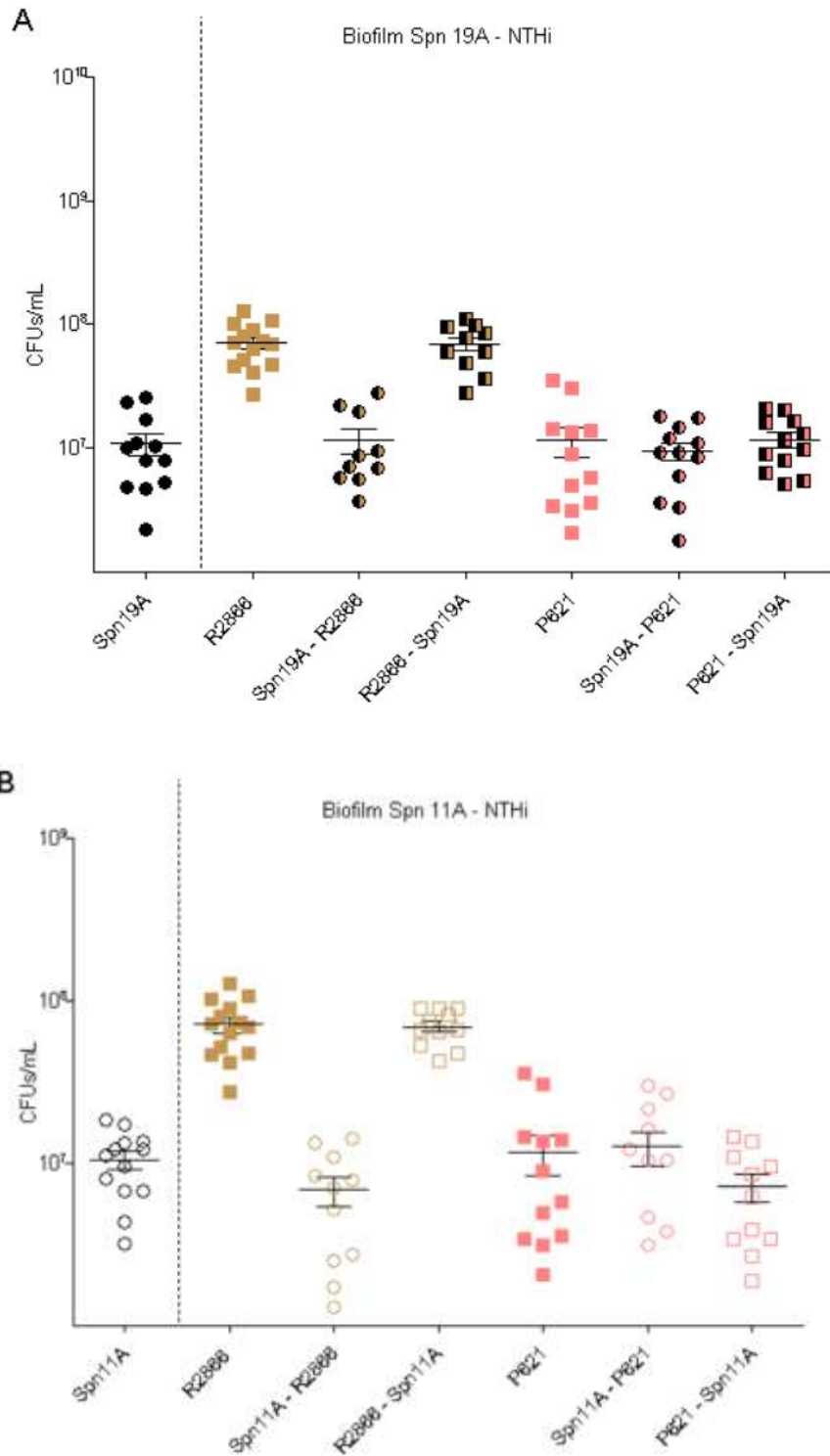
**Figura 24.** Recuento de bacterias viables en mono- y co-cultivos Spn-NTHi. Los cultivos se crecieron en sC+Y en estático durante 6 h, se diluyeron, y se plaquearon diluciones seriadas en sHTM-agar (*H. influenzae*) y TSA-sangre (Spn19A, panel A; Spn11A, panel B). Se muestran los datos procedentes de 6 ensayos independientes. Análisis estadístico, one-way ANOVA y Tukey Test.

Tal y como muestra la **Figura 24**, el co-cultivo con el serotipo Spn19A disminuye la viabilidad de las cepas Hi R2866 ( $p < 0.001$ ) y P676 ( $p < 0.01$ ). No se observaron diferencias significativas en el caso de las demás cepas estudiadas. En cuanto al serotipo Spn11A, el resultado fue similar, con una disminución



de viabilidad de las cepas NTHi R2866 ( $p < 0.001$ ) y P676 ( $p < 0.001$ ) en co-cultivo, respecto a los correspondientes monocultivos.

### 7.2.2 Análisis de la dinámica de co-cultivo *H. influenzae*-serotipos emergentes de *S. pneumoniae*, en fase biofilm.

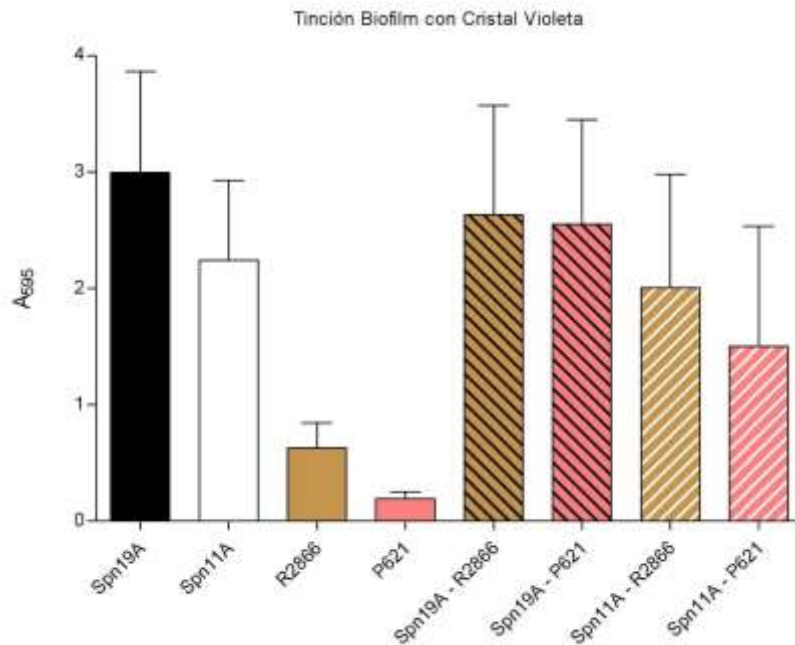


**Figura 25.** Recuento de bacterias viables en mono- y co-cultivos Spn-NTHi, cepas R2866 y P621. Los cultivos se crecieron en sC+Y en estático durante 6 h, se diluyeron; se realizó la disrupción mecánica de los biofilms, y se plaquearon diluciones seriadas en sHTM-agar (*H. influenzae*) y TSA-sangre (Spn19A, panel **A**; Spn11A, panel **B**). Análisis estadístico, one-way ANOVA y Tukey Test.



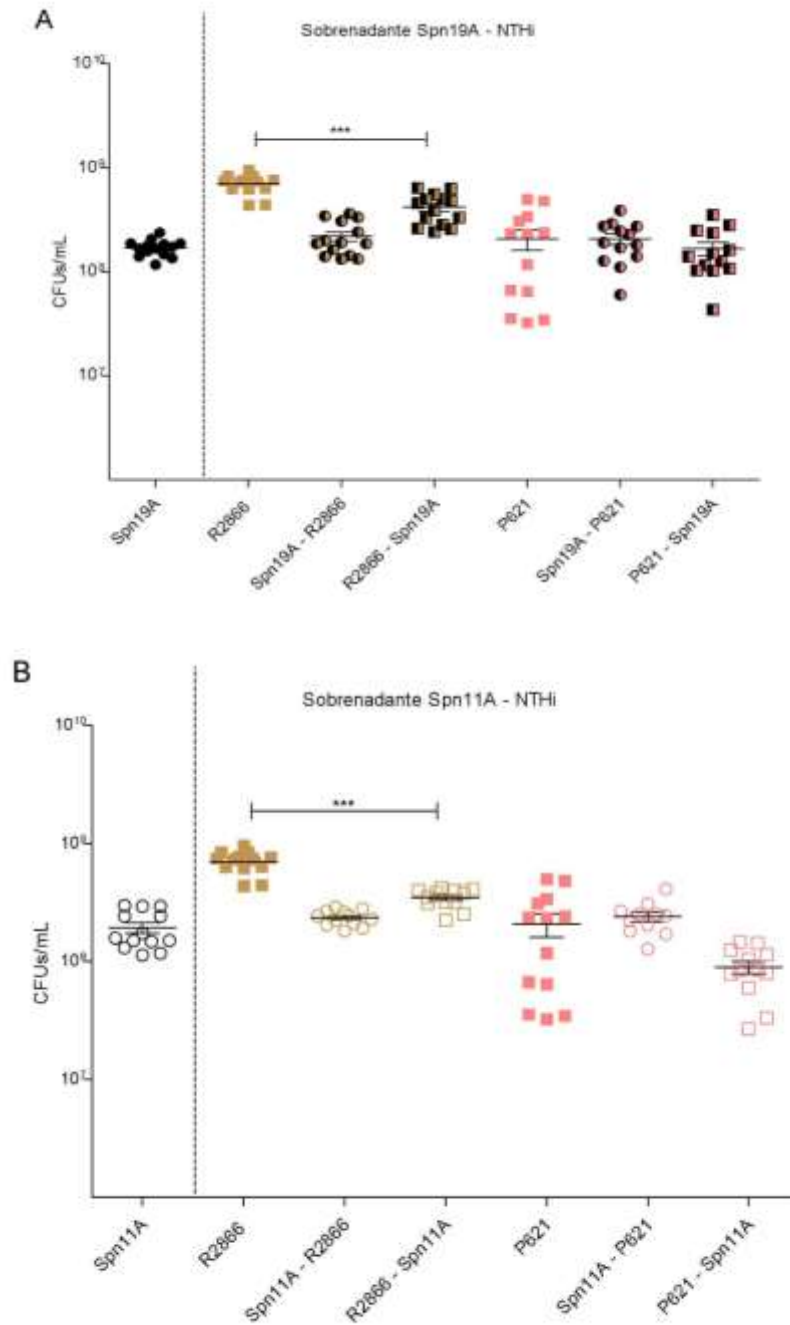
Tal y como muestra la **Figura 25**, no se observaron diferencias significativas en la capacidad de formación de biofilm entre los mono- y co-cultivos en respectivos de las cepas Spn y NTHi estudiadas.

De forma complementaria, se cuantificó el biofilm formado mediante tinción con cristal violeta. Se observó una capacidad de formación de biofilm decreciente entre Spn19A, Spn11A, NTHi R2866 y NTHi P621. En el caso de los co-cultivos, la formación de biofilm pareció corresponder a la de los respectivos monocultivos de Spn19A y Spn11A (**Figura 26**).



**Figura 26.** Cuantificación de formación de biofilm mediante tinción con cristal violeta y determinación de absorbancia a 595 nm. En el eje X, están representados mediante diagrama de barras con su correspondiente desviación típica cada uno de los tipos de cultivos; las barras mono-color representan los diferentes mono-cultivos; las barras rayadas, representan los diferentes co-cultivos Spn-NTHi. No se realizó análisis estadístico de estos datos.

Además, se realizó una cuantificación de bacterias viables en los sobrenadantes de los pocillos donde se realizaron los ensayos de tipo biofilm (**Figura 27**).

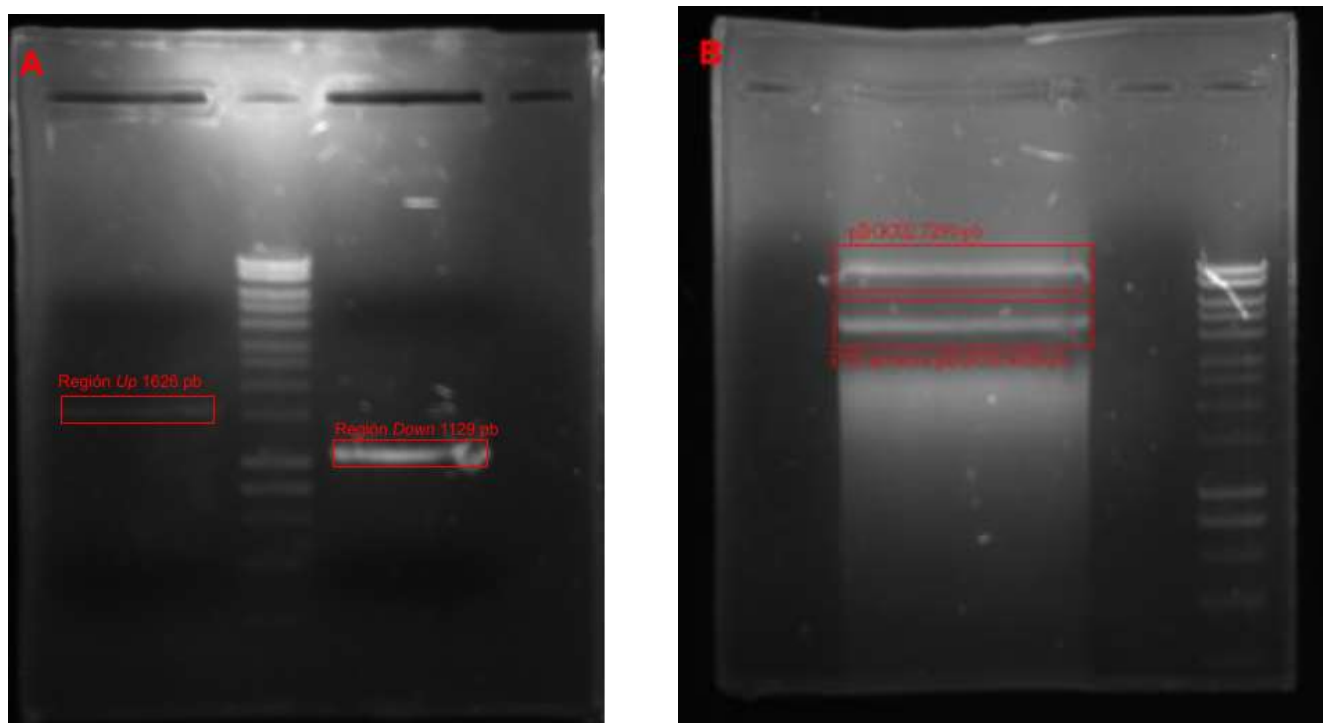


**Figura 27.** Recuento de bacterias viables en mono- y co-cultivos Spn-NTHi. Los cultivos se crecieron en sC+Y en estático durante 6 h, se diluyeron, y se plaquearon diluciones seriadas en sHTM-agar (*H. influenzae*) y agar-sangre (Spn19A, panel **A**; Spn11A, panel **B**). Se muestran los datos procedentes de 6 ensayos independientes. Análisis estadístico, one-way ANOVA y Tukey Test.

Tal y como muestra la **Figura 27**, se observó una disminución en la viabilidad de R2866 en co-cultivo con Spn19A ( $p < 0.001$ ), con Spn11A ( $p < 0.001$ ).

### 7.3 Primeros pasos en la generación de un *cassette* de inactivación génica para *F. nucleatum* ATCC23726.

Tal y como se indica en la sección de métodos, durante la realización de este Trabajo de Fin de Grado se han iniciado las primeras etapas para la inactivación del gen que codifica una ornitina decarboxilasa en *F. nucleatum*. A continuación, mostramos los productos de amplificación de los fragmentos *Up* and *Down* para generación de *cassette* de disrupción (gel en panel A), y el producto de amplificación del vector pBGC02 mediante PCR inversa (gel en panel B), **Figura 28**.



**Figura 28.** Separación electroforética de productos de amplificación para ingeniería genética de *F. nucleatum* ATCC23726. **A)** Regiones *Up* (izquierda, 1.626 pb) y *Down* (derecha, 1.129 pb) obtenidas mediante amplificación con cebadores OcdUp\_FW\_XhoI y OcdUp\_Rv\_SphI (*Up*) y OcdDn\_FW\_SphI y OcdUp\_Rv\_KpnI (*Down*), utilizando DNA génomico de la cepa ATCC23726 como molde. **B)** Amplificación mediante PCR inversa del vector pBGC02, con los cebadores pBGC02\_FW\_HindIII y pBGC02\_RV\_SalI\_2639. El producto de amplificación, de 4.819 pb corresponde a la banda inferior, tras eliminación de las regiones *pcw6-R* y *repA* mediante la citada PCR inversa. En la parte superior del gel, encontramos una banda que puede corresponder al molde (pBGC02).

Si bien los avances logrados en esta parte del trabajo son limitados, hemos amplificado con éxito las regiones flanqueantes (denominadas *Up* y *Down*) al gen que codifica una ornitina decarboxilasa, como punto de inicio en el diseño de la inactivación de este gen en *F. nucleatum* ATCC23726.

También hemos generado *E. coli* TOP10 quimiocompetentes, empleadas para transformar, propagar, y purificar el plásmido pBGC02, utilizado como molde en una reacción de PCR inversa para generar un vector de clonaje para las regiones *Up* y *Down*. Los siguientes pasos a realizar son la ligación de ambas regiones flanqueantes mediante PCR solapante para generar un inserto *Up +Down* que será clonado en el producto de PCR inversa de pBGC02 (**Figura 9**).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Efecto anti-biofilm de (*E*)-trans-2-nonenal sobre *H. influenzae* RdKW20 y *F. nucleatum* ATCC25586

Los resultados obtenidos en el análisis del efecto de (*E*)-trans-2-nonenal en la formación de biofilms puros y mixtos *H. influenzae*-*F. nucleatum* en anaerobiosis, sugieren que existe un efecto inhibitorio en la capacidad de formación de biofilm de ambas especies, si bien es menor cuando forman biofilms mixtos. Esto puede ser relevante desde el punto de vista clínico, dado que estos dos microorganismos conviven en vías respiratorias bajas de pacientes que sufren enfermedades respiratorias crónicas como es la EPOC. Este trabajo ha intentado comprender mejor las relaciones entre ambas especies mediante el modelado *in vitro* de co-cultivos, y cómo esta convivencia puede modular su supervivencia, en especial en la formación de biofilms. Los resultados obtenidos sugieren que la coexistencia de ambos microorganismos puede tener un efecto positivo sobre los mismos, de manera que son necesarias concentraciones más altas de compuesto (*E*)-trans-2-nonenal para inhibir el crecimiento bacteriano.

Inicialmente, este era el proyecto principal en el que planteamos centrar este Trabajo de Fin de Grado. Sin embargo, debido a un problema con el sellado correcto de la cámara de anaerobiosis, el equipo quedó inactivo en el mes de marzo, lo que únicamente nos ha permitido generar datos que son preliminares, pero no confirmarlos con las réplicas biológicas necesarias. No obstante, hay varios aspectos que podemos discutir: un reto en los ensayos de mono- y co-cultivo *H. influenzae*-*F. nucleatum* ha sido solventar problemas de contaminación cruzada entre especies. El medio PVX-agar permite el crecimiento de ambas, y observamos contaminación por *H. influenzae* en un buen número de placas destinadas a crecimiento de *F. nucleatum* procedente de mono-cultivos, invalidando parte de los datos. Una de las causas de este hecho puede ser la existencia de microgotas que pasan de un pocillo a otro en la placa (X24) durante el procesamiento, lo que se trató de solucionar usando una placa independiente por cada tipo de mono-cultivo, lo que supone un aumento considerable del uso de material fungible. Sin embargo, esta modificación no solucionó el problema, por lo que el trabajo se compartimentalizó en zonas de la campana de flujo laminar BIO-IIA separadas, y desinfectando todo el material usado al cambiar de cultivo. Estos cambios mejoraron los problemas de posible contaminación cruzada. Además, y de forma paralela, hemos optimizado con ensayo prueba-error todos los puntos del protocolo de ensayo de efecto anti-biofilm en co-cultivos NTHi-Fn, incluyendo las diluciones adecuadas para realizar el recuento de CFUs/mL. En cuanto al rango de concentraciones de (*E*)-trans-2-nonenal a testar, lo fuimos modificando progresivamente, inicialmente entre 0 y 100 µg/mL, y se aumentó posteriormente hasta 400 µg/mL, en función de la progresión de los datos. También, en inicio, generamos datos de tinción con cristal violeta, pero estos presentaban dispersión entre repeticiones debido a la labilidad del biofilm, por lo que fueron descartados. Todo ello, combinado con la duración del ensayo (5 días), ha limitado la consolidación de los resultados preliminares obtenidos.

En cualquier caso, los resultados obtenidos son preliminares pero prometedores, ya que sugieren que el co-cultivo *H. influenzae*-*F. nucleatum* puede tener efecto protector frente al efecto antimicrobiano del (*E*)-trans-2-nonenal. Estos datos pueden ser útiles a la hora de diseñar nuevas estrategias que nos ayuden a combatir infecciones persistentes en pacientes respiratorios crónicos. Sin embargo, reconocemos que son necesarias nuevas rondas de experimentos que apoyen la hipótesis inicial planteada y los resultados generados en este TFG. Por último, en este estudio hemos analizado el efecto de (*E*)-trans-2-nonenal

en la inhibición de la formación de biofilm; sin embargo, un aspecto interesante y complementario será estudiar cómo afecta este compuesto a biofilms mono- y poli-bacterianos previamente formados.

En cuanto a la producción de metabolitos por parte de estos cultivos, debido a la escasez de datos y la elevada variabilidad de estos, no se puede determinar que el co-cultivo tenga como consecuencia un aumento o disminución en su producción. Lo que sí puede observarse es que el ácido acético es el más excretado por estas bacterias, mientras que el ácido succínico es el menos común.

## 8.2 Dinámica de la interacción entre *S. pneumoniae* y *H. influenzae*

Los experimentos realizados durante este Trabajo de Fin de Grado han caracterizado aspectos relacionado con la interacción entre *S. pneumoniae* y *H. influenzae*, dos patógenos encontrados en las infecciones respiratorias y exacerbaciones de EPOC.

Previo a este trabajo, existía evidencia del efecto deletéreo de *S. pneumoniae* sobre *H. influenzae* a través de la producción de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un agente oxidante con efectos perjudiciales sobre *H. influenzae*. Estas observaciones se habían hecho con cepas de *S. pneumoniae* de serotipos no emergentes, en cultivos planctónicos (Cope et al., 2011). En este trabajo, empleamos cepas de los serotipos emergentes 19A y 11A, y observamos descenso en la viabilidad en las cepas NTHi R2866 y P676, en comparación con sus respectivos mono-cultivos. Sin embargo, no observamos efecto inhibitorio con las demás cepas de NTHi (375, P595, P621 y P657), lo que podría deberse a la producción de la enzima catalasa, que descompone el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno, protegiendo así a la bacteria del estrés oxidativo, teoría respaldada por la literatura (Harrison, Bakaletz, & Munson, 2012). Por otra parte, *S. pneumoniae* no parece verse afectada por la presencia o ausencia de NTHi. Por el contrario, en el caso de la formación de biofilms mixtos, no se aprecian cambios de viabilidad de las cepas de *S. pneumoniae* o *H. influenzae*, en comparación con sus respectivos cultivos puros.

Un aspecto interesante es la comparación entre los datos de bacterias viables en fase biofilm y la extrapolación de capacidad de formación de biofilm a partir de los datos de absorbancia tras tinción con cristal violeta, ya que los datos de absorbancia son mayores para *S. pneumoniae* que para *H. influenzae* (ver **Figura 25**), pero los recuentos CFU/mL son más elevados para las cepas de NTHi (ver **Figura 26**). La información que aporta cada ensayo es distinta, la tinción con cristal violeta tiñe biomasa y matriz extracelular, que puede ser más robusta por parte de *S. pneumoniae* a pesar de que la viabilidad de *H. influenzae* parece mayor.

Un posible avance en este proyecto sería el estudio del efecto de tratamientos antimicrobianos como el (*E*)-trans-2-nonenal para analizar la respuesta de estos cultivos, si bien esta posibilidad ha quedado fuera del ámbito de estudio de este Trabajo de Fin de Grado.

## 9. CONCLUSIONES

El trabajo experimental realizado durante este Trabajo de Fin de Grado ha llevado a las siguientes conclusiones:

1. El cinemaldehído (*E*)-trans-2-nonenal tiene efecto antimicrobiano dosis-dependiente frente a las cepas *H. influenzae* RdKW20 y *F. nucleatum* ATCC25586.
2. El efecto inhibitorio del (*E*)-trans-2-nonenal se observa en bacterias en fase planctónica y en fase biofilm, en cultivos crecidos durante 24 y 48 h.
3. En ambas especies, el efecto inhibitorio del (*E*)-trans-2-nonenal es mayor en cultivos puros (mono-cultivos) que en cultivos mixtos (co-cultivos) de las cepas *H. influenzae* RdKW20 y *F. nucleatum* ATCC25586.
4. En ambas especies, el efecto protector del co-cultivo es mayor en cultivos crecidos durante 48- que durante 24 h.
5. Los resultados disponibles sugieren que la cepa *H. influenzae* RdKW20 es más resistente al efecto inhibitorio de (*E*)-trans-2-nonenal que la cepa *F. nucleatum* ATCC25586.
6. La excreción de los metabolitos ácido acético, fórmico y succínico por *H. influenzae* RdKW20 y *F. nucleatum* ATCC25586 no parece ser modulada por el co-cultivo de las mismas.
7. El co-cultivo de *S. pneumoniae* Spn19A y Spn11A, pertenecientes a serotipos emergentes en el actual contexto de vacunación anti-neumocócica, con cepas clínicas de NTHi 375, R2866, P595, P621, P657 y P676, que son de distinto origen patológico (otitis media, infección invasiva y EPOC), resulta en indiferencia respecto a la viabilidad de las cepas de ambas especies.
8. El co-cultivo de *S. pneumoniae* Spn19A y Spn11A, con cepas clínicas de NTHi R2866 y P676, que son de distinto origen patológico (enfermedad invasiva y EPOC), reduce la viabilidad de estas últimas en fase planctónica.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. ESTRUCTURA Y FUNCIONES DEL SISTEMA RESPIRATORIO. (2021). *Neumología Pediátrica*, 13(3), 101-106. <https://doi.org/10.51451/np.v13i3.212>
2. Natalini, J. G., Singh, S., & Segal, L. N. (2023). The dynamic lung microbiome in health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 21(4), 222–235. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00821-x>
3. Wypych, T. P., Wickramasinghe, L. C., & Marsland, B. J. (2019). The influence of the microbiome on respiratory health. *Nature Immunology*, 20(10), 1279–1290. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0451-9>
4. Somayaji, R., & Chalmers, J. D. (2022). Just breathe: a review of sex and gender in chronic lung disease. *European Respiratory Review*, 31(163). <https://doi.org/10.1183/16000617.0111-2021>
5. Organización Mundial de la Salud. (2023). Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd))
6. Dickson, R. P., Martinez, F. J., & Huffnagle, G. B. (2014). The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases. *The Lancet*, 384(9944), 691-702. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61136-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61136-3)
7. Wedzicha, J. A., & Donaldson, G. C. (2003). Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Care*, 48(12), 1204-1213. PMID: 14651761
8. Agrawal, A., & Murphy, T. F. (2011). *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* type b conjugate vaccine era. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(10), 3728-3732. <https://doi.org/10.1128/jcm.05476-11>
9. Xiao, J., Su, L., Chen, X., Huang, S., Zhou, M., & Chen, Z. (2024). Molecular characteristics and biofilm formation capacity of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains isolated from lower respiratory tract in children. *Microbial Pathogenesis*, 190(2024), 0882-4010. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106632>
10. Islam, N., & Reid, D. (2024). Inhaled antibiotics: A promising drug delivery strategy for efficient treatment of lower respiratory tract infections (LRTIs) associated with antibiotic-resistant biofilm-dwelling and intracellular bacterial pathogens. *Respiratory Medicine*, 227, 107661. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2024.107661>
11. Swords, W. E. (2012). Quorum signaling and sensing by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 100. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00100>
12. Pang, B., Armbruster, C. E., Foster, G., Learman, B. S., Gandhi, U., & Swords, W. E. (2018). Autoinducer 2 (AI-2) production by nontypeable *Haemophilus influenzae* 86-028NP promotes expression of a predicted glycosyltransferase that is a determinant of biofilm maturation, prevention of dispersal, and persistence in vivo. *Infection and Immunity*, 86(12), e00506-18. <https://doi.org/10.1128/IAI.00506-18>
13. Li, Q., Tan, L., Wang, H., Kou, Y., Shi, X., Zhang, S., & Pan, Y. (2020). *Fusobacterium nucleatum* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* induces biofilm-associated antibiotic tolerance via *Fusobacterium* Adhesin A. *ACS Infectious Diseases*, 6(7), 1686–1696. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.9b00402>
14. Hong, W., Khampang, P., Erbe, C., Kumar, S., Taylor, S. R., & Kerschner, J. E. (2014). Nontypeable *Haemophilus influenzae* inhibits autolysis and fratricide of *Streptococcus*



- pneumoniae in vitro. Microbes and Infection*, 16(3), 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.11.006>
15. Asensio-López, J., Lázaro-Díez, M., Hernández-Cruz, T. M., Blanco-Cabra, N., Sorzabal-Bellido, I., Arroyo-Urea, E. M., Buetas, E., González-Paredes, A., Ortiz de Solórzano, C., Burgui, S., Torrents, E., Monteserín, M., & Garmendia, J. (2024). Multimodal evaluation of drug antibacterial activity reveals cinnamaldehyde analog anti-biofilm effects against *Haemophilus influenzae*. *Biofilm*, 7, 100178. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2024.100178>
  16. Cope, E. K., Goldstein-Daruech, N., Kofonow, J. M., Christensen, L., McDermott, B., et al. (2011). Regulation of virulence gene expression resulting from *Streptococcus pneumoniae* and nontypeable *Haemophilus influenzae* interactions in chronic disease. *PLOS ONE*, 6(12), e28523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028523>
  17. Harrison, A., Bakaletz, L. O., & Munson, R. S. (2012). *Haemophilus influenzae* and oxidative stress. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 40. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00040>
  18. Chang, B., Kinjo, Y., Morita, M., Tamura, K., Watanabe, H., Tanabe, Y., Kuronuma, K., Fujita, J., Oshima, K., Maruyama, T., Abe, S., Kasahara, K., Nishi, J., Kubota, T., Ohnishi, M., Suga, S., & Oishi, K. (2021). Distribution and variation of serotypes and pneumococcal surface protein A clades of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from adult patients with invasive pneumococcal disease in Japan. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 617573. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.617573>
  19. Hood, D. W., Makepeace, K., Deadman, M. E., Rest, R. F., Thibault, P., Martin, A., Richards, J. C., & Moxon, E. R. (1999). Sialic acid in the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*: Strain distribution, influence on serum resistance and structural characterization. *Molecular Microbiology*, 33(4), 679–692. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01509.x>
  20. Ho, D. K., Ram, S., Nelson, K. L., Bonthuis, P. J., & Smith, A. L. (2007). *IgtC* expression modulates resistance to C4b deposition on an invasive nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Journal of Immunology*, 178(2), 1002–1012. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.2.1002>
  21. Shahbaaz, M., Imtaiyaz Hassan, M., & Ahmad, F. (2013). Functional annotation of conserved hypothetical proteins from *Haemophilus influenzae* Rd KW20. *PLoS ONE*, 8(12), e84263. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084263>
  22. National Human Genome Institute. (2013). 1995: *Two Microbial Genomes Sequenced*. Retrieved from <https://www.genome.gov>
  23. Domenech, M., Damián, D., Ardanuy, C., Liñares, J., & Fenoll, A. (2015). Emerging, non-PCV13 serotypes 11A and 35B of *Streptococcus pneumoniae* show high potential for biofilm formation in vitro. *PLoS ONE*, 10(4), e0125636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125636>
  24. Zhou, M., Wang, Z., Zhang, L., Kudinha, T., An, H., Qian, C., Jiang, B., Wang, Y., Xu, Y., Liu, Z., Zhang, H., & Zhang, J. (2022). Serotype distribution, antimicrobial susceptibility, multilocus sequencing type and virulence of invasive *Streptococcus pneumoniae* in China: A six-year multicenter study. *Frontiers in Microbiology*, 12, 798750. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.798750>
  25. National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2024). Taxonomy browser (*Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 23726). Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF\\_000178895.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_000178895.1/)
  26. Megazyme. (2018). Acetic acid assay procedure (K-ACETRM). Megazyme International Ireland Ltd. Retrieved from <https://www.megazyme.com/acetic-acid-assay-kit>
  27. Megazyme. (2018). Formic acid assay procedure (K-FORM). Megazyme International Ireland Ltd. Retrieved from <https://www.megazyme.com/formic-acid-assay-kit>



28. Megazyme. (2021). Succinic acid assay protocol (K-SUCC). Megazyme International Ireland Ltd. Retrieved from <https://support.megazyme.com/support/solutions/articles/8000025239-succinic-acid-k-succ-assay-protocol>
29. López-López, N., Euba, B., Hill, J., Dhouib, R., Caballero, L., Leiva, J., Hosmer, J., Cuesta, S., Ramos-Vivas, J., & Díez-Martínez, R. (2020). *Haemophilus influenzae* glucose catabolism leading to production of the immunometabolite acetate has a key contribution to the host-airway-pathogen interplay. *ACS Infectious Diseases*, 6(3), 406-421. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00359>
30. Wu, C., & colaboradores. (2023). HicA toxin-based counterselection marker for allelic exchange mutations in *Fusobacterium nucleatum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(4), e00091-23. <https://doi.org/10.1128/aem.00091-23>
31. Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle—expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
32. Ling, Y., Zhao, T., Zhu, Y., Duan, M., Wu, W., & Wu, J. (2024). L-lysine as a potential agent for controlling biofilm formation using *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *The Open Dentistry Journal*, 18, e18742106288097. <https://doi.org/10.2174/0118742106288097240209103545>
33. Gil-Campillo, C., González-Díaz, A., Rapún-Araiz, B., Iriarte-Elizaintzin, O., Elizalde-Gutiérrez, I., Fernández-Calvet, A., Lázaro-Díez, M., Martí, S., & Garmendia, J. (2023). Imipenem heteroresistance but not tolerance in *Haemophilus influenzae* during chronic lung infection associated with chronic obstructive pulmonary disease. *Frontiers in microbiology*, 14, 1253623. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1253623>