



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Participación de las enzimas betaína aldehído y
glucosa-6-fosfato deshidrogenasas en la tolerancia de
Pseudomonas aeruginosa PAO1 hacia el estrés
oxidativo**

TESIS

Que para obtener el título de Bióloga

P R E S E N T A:

Arely Ivonne Marcos Vilchis

Director: Dr. Roberto Velasco García



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mi madre, que gracias a su esfuerzo y entrega, me fue posible continuar con mis estudios.

A mis hermanos, que siempre me han apoyado en mis decisiones.

A mi pequeñita compañera peluda que siempre ha estado para sacarme una sonrisa, a ti
Zelda.

A Kevin, quien me ha ayudado mucho en este camino. Gracias por tu compañía.

A ti Marisol, por ser una de mis más grandes amigas de la preparatoria (¡y contando!), tu
humor y sarcasmo siempre me han puesto de buenas.

A mis grandes amigos y compañeros de la carrera, Jen, Yetza y Jorge, quienes siempre me
han hecho pasar momentos amenos y me han ayudado siempre que lo he necesitado.

A un compañero, que con su ejemplo me ayudo a seguir adelante. A Félix.

Agradecimientos

A nuestra máxima casa de estudios: la Universidad Nacional Autónoma de México.

A mi asesor, el Dr. Roberto Velasco García, que me aceptó en su laboratorio y que gracias a su paciencia y conocimientos, ayudaron en mi formación académica. Ha sido un honor poder aprender de usted.

Al Dr. Hugo Perales, por su amable atención y sus observaciones tan pertinentes que sirvieron para mejorar este trabajo.

A mis sinodales, por las sugerencias y comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo.

También agradecemos al Biól. Luis Barbo y al Dr. César Flores por el apoyo brindado para el uso del HPLC.

El presente trabajo fue financiado por la UNAM, a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación y Tecnológica (PAPIIT) de la DGAPA (Proyecto IN228811).

The same thing that makes you live, can kill you in the end

-Neil Young

Contenido

Índice de figuras.....	2
Índice de tablas	3
Abreviaturas.....	4
Resumen	5
Abstract	7
1.- Introducción.....	9
2.- Hipótesis.....	17
3.- Objetivo general.....	17
3.1 Objetivos particulares	17
4.- Material y métodos	18
4.1 Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y confirmación de la carencia de BADH o G6PDH en las mutantes.....	18
4.2 Determinación de la sensibilidad hacia el estrés oxidativo causado por H ₂ O ₂	19
4.3 Obtención de la fracción soluble de las células	20
4.4 Medición de las actividades enzimáticas	20
4.5 Cuantificación de coenzimas.....	21
4.5.1 ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO.....	21
4.5.2 ANÁLISIS POR HPLC	22
5.- Resultados y discusión.....	23
5.1 Confirmación de la mutación en los genes <i>zwf</i> y <i>betB</i>	23
5.2 Respuesta al estrés oxidativo bajo diferentes fuentes de carbono	25
5.3 Efecto de la fuente de carbono en la actividad de las principales enzimas productoras de NAPDH, bajo un estrés oxidativo	38
5.4 Línea primaria de defensa contra el estrés oxidativo: las enzimas antioxidantes.....	44
5.5 Cuantificación de las coenzimas NADPH y NADP ⁺	47
6.- Conclusiones	56
7.- Perspectivas	59
8.- Referencias	60

Índice de figuras

Figura 1. Metabolismo de fosfatidilcolina en <i>P. aeruginosa</i>	11
Figura 2. Relación de las enzimas productoras de NADPH con las antioxidantes.....	13
Figura 3. Vías de degradación de la glucosa en <i>P. aeruginosa</i>	14
Figura 4. Crecimiento de la cepa silvestre de <i>P. aeruginosa</i> sometida a estrés oxidativo con H ₂ O ₂ , en los medios de cultivo que se indican en cada gráfica.	27
Figura 5. Porcentaje de crecimiento en la cepa silvestre..... después de exponerla 6 horas a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂ , en las tres fuentes de carbono.	28
Figura 6. Estabilidad del H ₂ O ₂ , a lo largo de 6 horas..... que duraron los experimentos, en los medios MCGlice (A) y MGlu (B).	29
Figura 7. Crecimiento de las cepas mutantes <i>zwf</i> y <i>betB</i> de <i>P. aeruginosa</i> sometidas a estrés oxidativo con H ₂ O ₂ , en los medios de cultivo que se indican.	31
Figura 8. Comparación del crecimiento alcanzado por la cepa silvestre..... y las mutantes <i>betB</i> y <i>zwf</i> , después de exponerlas 6 horas a diferentes concentraciones de H ₂ O ₂ en los medios MGlu (A), MCGlice (B) y MCGlu (C).	32
Figura 9. Metabolismo del glicerol en <i>P. aeruginosa</i>	35
Figura 10. Actividad específica de las enzimas productoras de NAPDH..... en la cepa silvestre de <i>P. aeruginosa</i> sometida a estrés oxidativo (H ₂ O ₂), en los medios de cultivo indicados.	40
Figura 11. Actividad específica de las enzimas productoras de NAPDH..... en las cepas mutantes <i>zwf</i> y <i>betB</i> de <i>P. aeruginosa</i> sometida a estrés oxidativo (H ₂ O ₂), en los medios de cultivo indicados.	42
Figura 12. Dos sistemas de ciclamiento enzimático utilizados..... para amplificar los niveles de NADP ⁺ y NADPH.	48
Figura 13. Curva patrón de NADP ⁺ para la cuantificación de nucleótidos..... de piridina.	50
Figura 14. Cromatograma de la extracción ácida de la cepa silvestre y (A)..... la extracción ácida enriquecida con NADP ⁺ 100µm, NADPH 100 µM, NAD ⁺ 50 µM y NADH 50 µM (B).	52

Figura 15. Cromatograma de la extracción ácida con un control interno.....53
de NADP⁺ 200 μM (A) o NAD⁺ 100 μM (B).

Figura 16. Cromatograma de la extracción básica de la cepa silvestre.....54

Figura 17. Cromatograma de la extracción básica de la cepa silvestre.....55
enriquecida con un control interno de NADPH 200 μM (A) y, enriquecida con NADH 100 μM
(B).

Índice de tablas

Tabla 1. Programa de gradiente empleado para la detección de nucleótidos.....22
por HPLC.

Tabla 2. Crecimiento de las cepas silvestre y las mutantes *zwf*.....24
y *betB*, de *P. aeruginosa* en medios de cultivo con diferente fuente de carbono.

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de.....28
duplicación (*t_d*) de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* en los medios de cultivo con diferentes
fuentes de carbono en condiciones de estrés oxidativo con H₂O₂.

Tabla 4. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de.....31
duplicación (*t_d*) de la cepa silvestre y la mutante *zwf* de *P. aeruginosa* en MGlu, bajo un estrés
oxidativo con H₂O₂.

Tabla 5. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de.....33
duplicación (*t_d*) en la cepa silvestre y la mutante *betB* de *P. aeruginosa* en MCGlice, bajo un
estrés oxidativo con H₂O₂.

Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de.....36
duplicación (*t_d*) en la cepa silvestre y las mutantes *zwf* y *betB* de *P. aeruginosa* en MCGlu,
bajo un estrés oxidativo con H₂O₂.

Tabla 7. Cuantificación de coenzimas extraídas con ácido para.....50
la forma oxidada o base para la forma reducida.

Abreviaturas

Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ahp	Alquil hidroxiperóxido reductasa
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Cat	Catalasa
BA	Betaína aldehído
BADH	Betaína aldehído deshidrogenasa
FC	Fosfatidilcolina
FQ	Fibrosis quística
G3PDH	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GB	Glicina betaína
GPrx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducida
GSSG	Glutación oxidado
GR	Glutación reductasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HCl	Ácido clorhídrico
IDH-NADP ⁺	Isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP ⁺
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
LB	Luria-Broth
MCol	M63 + colina
MCGlice	M63 + colina + glicerol
MCGlu	M63 + colina + glucosa
MGlu	M63 + glucosa
MnCl ₂	Cloruro de manganeso
NADP ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (oxidado)
NAD ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido (oxidado)
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (reducido)
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido (reducido)
NaOH	Hidróxido de Sodio
O ₂ ^{·-}	Superóxido
·OH	Radical hidroxilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno (del inglés Reactive Oxygen Species)
SOD	Superóxido dismutasa

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista que puede infectar a las personas inmunocomprometidas, como aquellas con fibrosis quística. Las infecciones pulmonares causadas por esta bacteria parecen ser facilitadas por la presencia de fosfatidilcolina (FC) en el surfactante pulmonar, que el microorganismo utiliza como fuente de carbono y nitrógeno. Sin embargo, es también en las vías respiratorias en donde *P. aeruginosa* enfrenta altos niveles de especies reactivas del oxígeno, y a las que combate con un sistema enzimático especializado dependiente del poder reductor proporcionado por el NADPH. En el presente trabajo se estudió la participación de las deshidrogenasas de betaína aldehído (BADH), glucosa-6-fosfato (G6PDH) e isocitrato (IDH-NADP⁺) productoras de NADPH, en la tolerancia hacia el estrés oxidativo provocado por H₂O₂. La BADH es una enzima inducible por FC o por los intermediarios de su metabolismo; las otras dos enzimas son constitutivas y diversos estudios las proponen, principalmente a G6PDH, como productoras del poder reductor requerido para combatir el estrés mencionado. Como hipótesis se planteó que en condiciones nutricionales similares a las que se presentan en el pulmón, en donde existen intermediarios del metabolismo de FC como fuente de carbono y nitrógeno, la BADH tendría una mayor participación en la tolerancia de *P. aeruginosa* hacia el estrés oxidativo. Esta suposición fue probada exponiendo la cepa silvestre PAO1 de *P. aeruginosa* y dos mutantes que carecían de las actividades de G6PDH (mutante *zwf*) o de BADH (mutante *betB*), a ocho diferentes concentraciones de H₂O₂ (de 0 a 75 mM) en medios de crecimiento con glucosa (MGlu), colina-glicerol (MCGlice) y glucosa-colina (MCGlu). Se obtuvieron las curvas de crecimiento de cada cultivo celular y se determinaron las actividades específicas de las deshidrogenasas mencionadas anteriormente. Además, se realizaron metodologías para determinar los niveles intracelulares de las coenzimas NADP⁺ y NADPH.

Los resultados mostraron que la cepa silvestre tolera mejor el estrés oxidativo provocado por H_2O_2 creciendo en MCGlu, que en MGlu y MCGlice, sugiriendo una participación sinérgica de las enzimas G6PDH, BADH y de la IDH-NADP⁺, de acuerdo a los resultados de actividad enzimática obtenidos. Los resultados de los experimentos con las mutantes carentes de estas enzimas, apoyan esta sinergia entre las tres enzimas mencionadas, y, contrario a lo reportado para G6PDH en la literatura, indican que tanto esta enzima como la BADH no participan substancialmente en la tolerancia de *P. aeruginosa*. De estos últimos resultados destaca también el que la mutante *betB* creciendo en MCGlice, en donde no participarían ni G6PDH ni BADH, tolere el H_2O_2 al mismo grado que la cepa silvestre, sugiriendo que el metabolismo del glicerol, más que el de la colina, podría involucrarse en esta tolerancia. Respecto a la determinación de las coenzimas NADP⁺ y NADPH se debe mencionar que a pesar de intentarlo con dos métodos diferentes, ciclamiento enzimático y separación con HPLC, resultó infructuosa. La razón de este resultado podría encontrarse en la misma naturaleza de la bacteria *P. aeruginosa*, al poseer compuestos o enzimas que durante la extracción de las coenzimas, podrían quelarlas o degradarlas, respectivamente.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that can infect immunocompromised people, as those with cystic fibrosis. The pulmonary infections caused by this bacteria, seems to be facilitated by the presence of phosphatidylcholine in the pulmonary surfactant, which is used by the microorganism as a carbon and nitrogen source. However, it is also in the airways where *P. aeruginosa* deals with high levels of reactive oxygen species, and it fights them with a specialized enzymatic system dependent of the reductive power of the NADPH. In the current work, the participation of the dehydrogenases of betaine aldehyde (BADH), glucose-6-phosphate (G6PDH) and isocitrate (IDH-NADP⁺) producers of NADPH, were studied under the tolerance to oxidative stress caused by H₂O₂. The BADH is an phosphatidylcholine inducible enzyme or by the intermediaries of its metabolism; the other two enzymes are constitutive and are proposed in various studies, mainly the G6PDH, as producers of the reducing power required to deal with the aforementioned stress. As an hypothesis it was layed out that in nutritious conditions similar to those in the lungs, where there are intermediaries of the phosphatidylcholine metabolism as a carbon and nitrogen source, the BADH would have a mayor role in the tolerance of *P. aeruginosa* to the oxidative stress. This assumption was tested exposing the wild type strain PAO1 of *P. aeruginosa* and two other mutants that lacked activities of G6PDH (*zwf* mutant) or BADH (*betB* mutant), to eight different concentrations of H₂O₂ (from 0 to 75 mM) in growth mediums with glucose (MGlu), choline plus glycerol (MCGlice) and glucose plus choline (MGlu). Growth curves of each cell culture were obtained and specific activities of the dehydrogenases aforementioned were determined. Also it was attempted to know the intracellular levels of the NADP⁺ y NADPH coenzymes.

The results showed that the wild type strain tolerates the oxidative stress better growing in MCGlu than growing in MGlu y MCGlice, suggesting a synergic participation of the enzymes G6PDH, BADH and IDH-NADP⁺, this according to the results of enzymatic activity obtained. The results of the experiments with the mutants lacking these enzymes supports the synergy between three of these enzymes aforementioned, and contrary to what it was reported previously for G6PDH, it indicates that this enzyme as the BADH are not substantially involved in the tolerance of *P. aeruginosa*. Of these last results it also stands out the mutant *betB* growing in MCGlice, where it would not participate nor G6PDH nor BADH, tolerates H₂O₂ at the same degree as the wild type strain, suggesting that glycerol metabolism, rather than choline, could be involved in this tolerance. Regarding the determination of NADP⁺ and NADPH coenzymes it should be mentioned that despite trying two different methods, enzymatic cycling and HPLC separation, was unsuccessful. The reason for this result may lie in the very nature of the bacteria *P. aeruginosa*, possessing compounds, that during coenzyme extraction, they could be chelated or degraded by enzymes.

1.- Introducción

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram negativa, ubicua, considerada como un patógeno oportunista en el humano ya que infecta a las personas inmunocomprometidas, por presentar algún factor o enfermedad que las predispone a dicha infección, entre los que se encuentran: las quemaduras, los trasplantes de órganos, la neumonía, el cáncer, el sida y la fibrosis quística (FQ) (Berrouane *et al.*, 2000). Además, *P. aeruginosa* es reconocida como un patógeno nosocomial primario (Lebeque *et al.*, 2006) que causa bacteremia en víctimas de quemaduras, infecciones del tracto urinario en pacientes con catéteres e incluso neumonía en pacientes con respiradores; como consecuencia, la infección por esta bacteria es la causa predominante de morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ (Stover *et al.*, 2000), ya que éstos son susceptibles a las infecciones pulmonares crónicas causadas por *P. aeruginosa* (Van Delden e Iglewski, 1998; Oliver *et al.*, 2000).

La FQ es una enfermedad genética causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, del inglés *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), que afecta la función de este canal iónico presente en células epiteliales y células de la sangre. La principal función de CFTR es fungir como un canal de cloro, pero también se involucra, ya sea indirecta o directamente, en la inhibición de transporte de sodio, la regulación de canales de ATP, la regulación del transporte intracelular de vesículas, la acidificación de organelos y la inhibición de los canales endógenos de cloro activados por calcio, entre otras (O'Sullivan y Freedman, 2009). La variabilidad de síntomas entre los pacientes con FQ es alta, pues se han identificado más de 1,500 mutaciones en este gen. Entre las señales que aparecen a lo largo de la vida del paciente destacan los trastornos pancreáticos y la infertilidad; sin embargo, es en los pulmones

donde se presenta el mayor reto, puesto que las infecciones crónicas son difícilmente erradicadas por un sistema inmune deficiente, propio de esta enfermedad, resultando en una exagerada inflamación de los pulmones y fallas en la eliminación de los principales patógenos, entre los que se encuentra *P. aeruginosa* (O'Sullivan y Freedman, 2009; Cohen y Prince, 2012).

Las infecciones pulmonares causadas por *P. aeruginosa*, parecen ser facilitadas por la presencia de una sustancia tensoactiva, el surfactante pulmonar, que mantiene estables a los alvéolos y evita su colapso después de cada ventilación (King, 1982). Este surfactante consiste en un complejo lipoproteico con aproximadamente 10% de proteínas y 90% de lípidos, siendo en su mayoría fosfolípidos, y entre los que la fosfatidilcolina (FC) es el más abundante (Blanco, 2004). Desafortunadamente para las personas con FQ, la FC puede ser utilizada por *P. aeruginosa* como fuente de carbono y nitrógeno durante su invasión pulmonar. Para esto, la bacteria secreta la fosfolipasa C que utiliza la FC como sustrato, obteniendo como productos diglicérido y a la fosforilcolina (Stinson y Hayden, 1979; Ostroff *et al.*, 1990; Van Delden e Iglewski, 1998). Posteriormente la enzima fosforilcolina fosfatasa, que es exportada por *P. aeruginosa* al espacio periplásmico, cataliza la hidrólisis de fosforilcolina a colina, (Domenech *et al.*, 2011) compuesto que provee de nitrógeno y carbono a la bacteria. A partir de la colina que ingresa al citoplasma del microorganismo, *P. aeruginosa* es capaz de producir glicina betaína (GB) (Fig. 1) (Velasco-García *et al.*, 1999; Wargo *et al.*, 2008), un compuesto osmoprotector que le permite a la bacteria adaptarse a un estrés osmótico, como el que existe en el interior del pulmón de los enfermos de FQ (Terry *et al.*, 1991; D'Souza-Ault *et al.*, 1992).

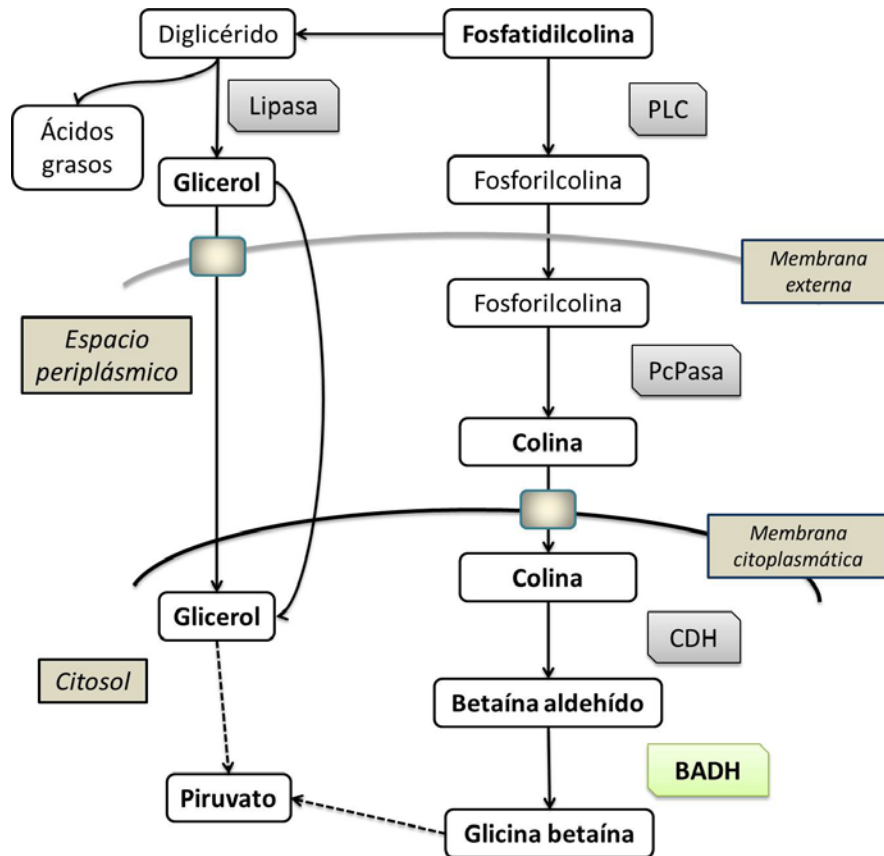


Figura 1. Metabolismo de fosfatidilcolina en *P. aeruginosa*. PLC: Fosfolipasa C; PcPasa: fosforilcolina fosfatasa; CDH: Colina deshidrogenasa; BADH: betaína aldehído deshidrogenasa. Se muestra el lugar donde se encuentra cada enzima. Las flechas punteadas indican una serie de reacciones no mostradas.

Los pulmones son los órganos más expuestos al oxígeno atmosférico y por lo tanto son el blanco primario de la toxicidad provocada por altos niveles de oxidantes, como son las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) entre las que se incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), entre otras. Estas moléculas pueden dañar componentes esenciales de la célula, como son el ADN, los lípidos de la membrana y las proteínas (Halliwell y Gutteridge, 2007). Las ROS son un subproducto del metabolismo normal (Bowler y Crapo, 2002), pero también pueden ser producidas exógenamente por las células endoteliales, los macrófagos y los neutrófilos

polimorfonucleares, como parte de los mecanismos de defensa del huésped hacia las infecciones (Turrens, 2003; Coiofu *et al.*, 2005). De manera específica, se ha encontrado que en las vías respiratorias de pacientes con FQ incrementan las cantidades de ROS sintetizadas por los neutrófilos polimorfonucleares, contribuyendo al estrés oxidativo (Cohen y Prince, 2012).

En *P. aeruginosa*, así como en muchos otros organismos, el sistema antioxidante enzimático conformado por la catalasa, la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa, entre otras, se encarga de combatir el estrés oxidativo causado *in vitro* por las ROS generadas por factores, como los elementos galio, aluminio y cobre (Singh, *et al.*, 2005; Teitzel *et al.*, 2006; Bériault *et al.*, 2007), los compuestos metil viológeno (paraquat) (Ma *et al.*, 1998), menadiona (Singh *et al.*, 2007), hidroxiperóxidos de cumeno y el hidroxiperóxido de *t*-butilo (Ochsner *et al.*, 2000) o el H₂O₂ (Brown *et al.*, 1995; Elkins *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2000); sin embargo, algunas enzimas de este sistema dependen del poder reductor proporcionado por el NADPH (Singh *et al.*, 2007) (Fig. 2). Por ejemplo, la catalasa es una enzima que neutraliza 2H₂O₂, produciendo 2H₂O y O₂, la reacción con el primer H₂O₂ oxida al Fe en el hemo y forma un intermediario con un grupo oxiferril con un radical de porfirina π -catiónico, esta estructura es conocida como el compuesto I, una forma activa de la enzima. Este paso es seguido por la oxidación de una segunda molécula de H₂O₂ por el compuesto I, para regresar a la enzima al estado basal o también conocido como ferricatalasa. Durante la exposición de la catalasa a las ROS, un electrón puede reducir al compuesto I, formando el compuesto II, que es una forma inactiva de la enzima (Kirkman y Gaetani, 2007). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que el NADPH protege a la catalasa,

previniendo la formación del compuesto II (Kirkman y Gaetani, 1984; Jouve *et al.*, 1986; Kirkman *et al.*, 1987, Hillar *et al.*, 1994; Kirkman *et al.*, 1999; Gaetani *et al.*, 2005).

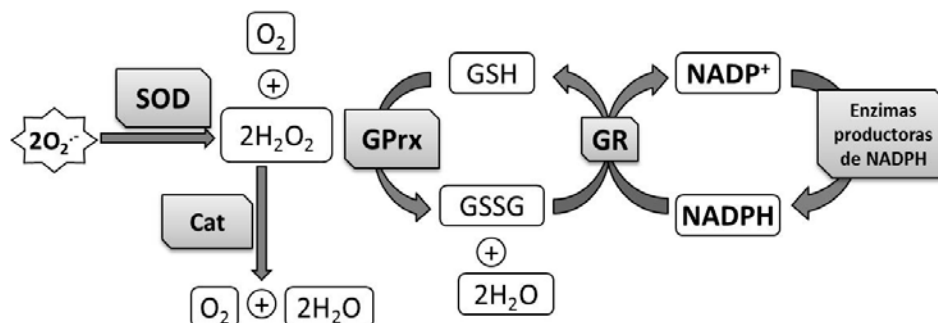


Figura 2. Relación de las enzimas productoras de NADPH con las antioxidantes. SOD: Superóxido dismutasa; Cat: Catalasa; GPrx: Glutatión peroxidasa; GR: glutatión reductasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado.

Una de las enzimas con alta relevancia por ser productora de NADPH es la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), que en *P. aeruginosa* participa en la vía de Entner-Doudoroff (Fig. 3) (Lessie y Neidhardt, 1967); esta vía representa una ruta central y constitutiva por la que dicho organismo cataboliza diferentes fuentes de carbono (García y Ponce, 2003). En *P. aeruginosa*, la G6PDH es una enzima constitutiva que puede incrementar su actividad cuando la bacteria crece en ciertas fuentes de carbono (glicerol, glucosa, fructosa, piruvato-glucosa) (Lessie y Neidhardt, 1967). Además, se ha encontrado que mutantes de *P. aeruginosa* carentes del gen *zwf*, que codifica para la G6PDH, incrementan su sensibilidad al estrés oxidativo generado por el paraquat (Ma *et al.*, 1998). También, se ha sugerido que la forma específica isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ (IDH-NADP⁺), una enzima constitutiva que participa en el ciclo de Krebs (Ragland *et al.*, 1966; Madigan *et al.*, 2012) (Fig. 3), podría ser relevante no sólo por la participación que tiene en esta importante vía

metabólica, pues se ha encontrado que su actividad incrementa en *P. fluorescens* sometida a un estrés oxidativo (Singh *et al.*, 2007).

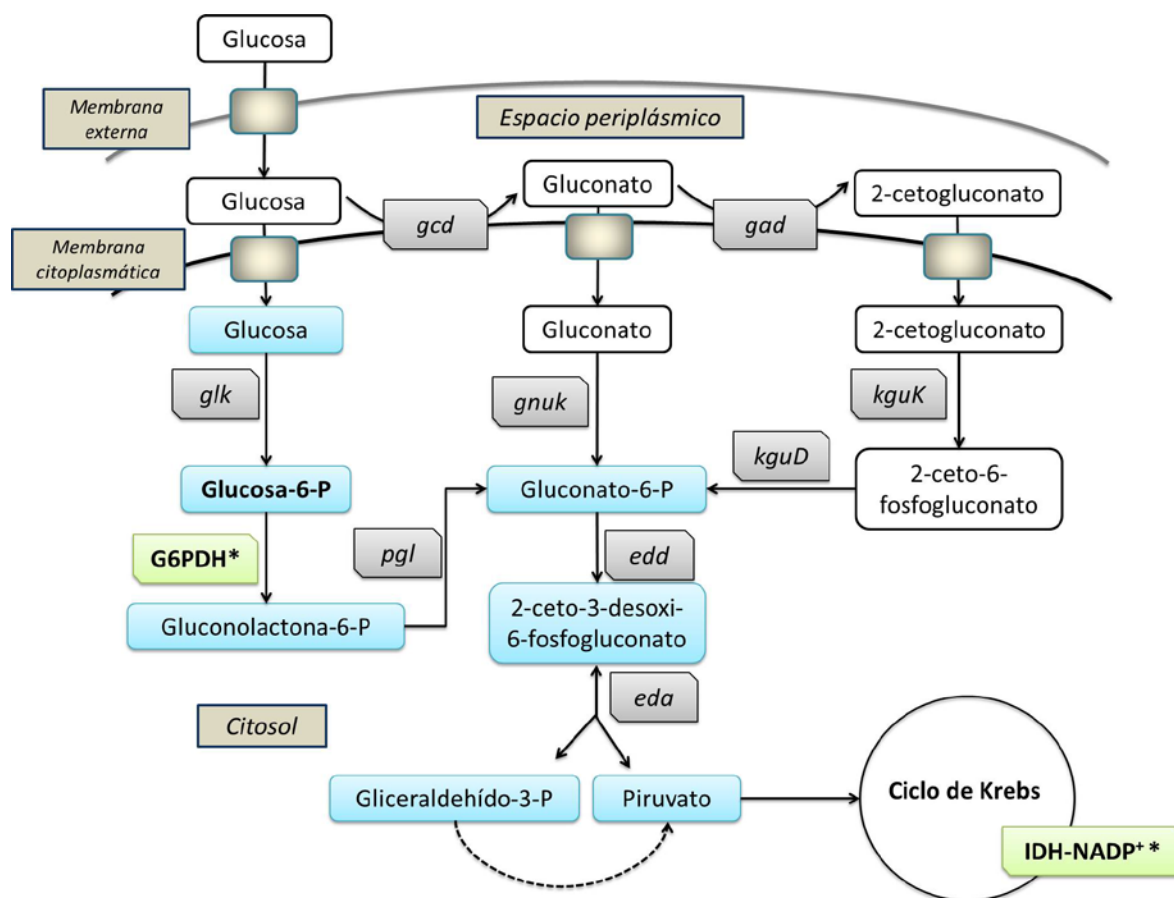


Figura 3. Vías de degradación de la glucosa en *P. aeruginosa*. *glk*: glucocinasa; *gcd*: glucosa deshidrogenasa; *gad*: gluconato oxidasa; G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; *pgl*: fosfogluconolactonasa; *edd*: gluconato-6-fosfato deshidratasa; *eda*: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa; *gnuk*: gluconato cinasa; *kguK*: 2-cetogluconato cinasa; *kguD*: 2-cetogluconato-6-fosfato deshidrogenasa; IDH-NADP⁺: isocitrato deshidrogenasa. *Enzimas productoras de NADPH. Los cuadros de color azul muestran a las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff. La flecha punteada indica una serie de reacciones no mostradas.

Como se discute a continuación, otra enzima que también podría ser importante en la tolerancia de *P. aeruginosa* hacia un estrés oxidativo es la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), que participa en el metabolismo de FC (Fig. 1). Se conocen las

características cinéticas de esta molécula y, al compararlas con las de la G6PDH, también de *P. aeruginosa*, se ha encontrado que las dos utilizan las coenzimas NAD^+ y NADP^+ , teniendo una mayor preferencia por ésta última (Velasco-García *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado que la afinidad de ambas enzimas por sus respectivos sustratos es parecida, así como su alta eficiencia catalítica (Ma *et al.*, 1998; Velasco-García *et al.*, 2000). Debido a estas similitudes, aunadas a la idéntica posición que tienen en sus respectivas vías, se puede inferir que la BADH podría sustituir o actuar junto con la G6PDH en su papel productor de NADPH, y por ende en la adaptación de *P. aeruginosa* hacia un estrés oxidativo. Además, como ya se señaló, la BADH participa en la vía que metaboliza FC (Fig. 1), que representa la principal fuente de nitrógeno y carbono en el pulmón, y se involucra directamente en la síntesis de la molécula osmoprotectora GB

Son y colaboradores (2007), realizaron un análisis con microarreglos de ADN, la primera parte del estudio se desarrolló *in vivo*, en donde se utilizaron células de *P. aeruginosa* obtenidas de esputo pulmonar de pacientes con FQ. La segunda parte del análisis fue *in vitro*, utilizando la misma bacteria creciendo con FC como única fuente de carbono. En el estudio se encontró que en ambos casos, se inducían los genes de un gran número de enzimas, entre las que se encontraban la fosfolipasa C, la colina deshidrogenasa, la BADH, la glicerol cinasa, la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y la G6PDH. Esta información sugiere que las vías en las que dichas enzimas participan, podría involucrarse en la adquisición de carbono y nitrógeno cuando el microorganismo crece en el surfactante pulmonar o bajo condiciones similares. Además, las enzimas productoras de NADPH podrían ser importantes para adaptarse a dicho ambiente.

En un trabajo reciente, realizado en el laboratorio donde se desarrolló este proyecto (datos no publicados), se encontró que cuando *P. aeruginosa* crece bajo condiciones nutricionales similares a las presentes en el surfactante pulmonar (en presencia de colina y glicerol), la bacteria presenta mayor tolerancia al estrés oxidativo provocado por H₂O₂, con un aumento de más de 30 veces en la actividad específica de BADH y un incremento en el cociente NADPH/NADP⁺, con relación a la bacterias crecidas en un medio rico en glucosa. Sin embargo, no hubo diferencias en las actividades de las enzimas G6PDH e IDH.

Por otro lado, en estudios realizados con la especie *P. fluorescens* creciendo en medio rico Luria-Bertani, la IDH y la G6PDH, incrementaron su actividad y expresión durante el estrés oxidativo provocado por la vitamina K3 (menadiona) (Singh *et al.*, 2007) y por el elemento galio (Bériault *et al.*, 2007). Estas diferencias en las actividades de las enzimas productoras de NADPH podrían deberse, como se mencionó antes, a la expresión diferencial que presentan dependiente de la fuente de carbono utilizada.

En un trabajo desarrollado por Jacobs y colaboradores (2003), se generó una biblioteca con cerca de 30,100 mutantes de la bacteria *P. aeruginosa* PAO1, utilizando la inserción al azar del transposón ISlacZ/hah. De estas mutantes se conoce la secuencia de nucleótidos que ha sido alterada, sin embargo, se desconoce su fenotipo, por lo que la mayor parte de las bacterias que integran esta colección están a la espera de ser caracterizadas. La utilización de las mutantes de esta colección carentes de las actividades de G6PDH y BADH podría ayudarnos a conocer la verdadera participación de estas enzimas en la tolerancia de *P. aeruginosa* hacia un estrés oxidativo, como proveedoras de NADPH.

2.- Hipótesis

La BADH de la bacteria *P. aeruginosa* podría participar en la tolerancia al estrés oxidativo presente en los pulmones, reemplazando a la G6PDH o contribuyendo con ésta y la IDH-NADP⁺ en su papel productor de poder reductor.

3.- Objetivo general

Determinar la participación de la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, en la producción de NADPH y en la tolerancia al estrés oxidativo, a través de la utilización de las cepas mutantes *betB* y *zwf* que carecen de estas enzimas.

3.1 Objetivos particulares

- Corroborar que las mutantes *zwf* y *betB* carecen de la actividad enzimática respectiva, y caracterizar su crecimiento en medios de cultivo que contienen como fuente de carbono, ya sea a la glucosa o a la colina con glicerol.
- Comparar la sensibilidad hacia el estrés oxidativo causado por H₂O₂, en la cepa silvestre de *P. aeruginosa* y en sus mutantes *zwf* y *betB*, en condiciones nutricionales similares que normalmente inducirían una mayor participación de G6PDH o de BADH en el metabolismo del carbono y en la síntesis de poder reductor.
- Determinar la actividad de las principales enzimas productoras de NADPH -G6PDH, IDH y BADH- en la cepa silvestre PAO1 y en las mutantes *zwf* y *betB* creciendo en las condiciones nutricionales antes mencionadas, en ausencia y presencia de estrés oxidativo.
- Determinar los niveles de las coenzimas NADP⁺ y NADPH en las cepas creciendo en las mismas condiciones nutricionales y de estrés mencionadas en el objetivo anterior.

4.- Material y métodos

4.1 Cepas bacterianas, condiciones de cultivo y confirmación de la carencia de BADH o G6PDH en las mutantes

Se trabajó con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 (silvestre) y con mutantes de la misma especie obtenidas por inserción del transposón ISlacZ/hah en los genes *zwf* y *betB* (Jacobs *et al.*, 2003). Estas mutantes fueron adquiridas de la colección de mutantes del Departamento de Ciencias Genómicas de la Universidad de Washington. Inicialmente todas las cepas se crecieron durante 12h en medio líquido Luria-Broth (LB) para después agregarles glicerol estéril hasta una concentración final de 12 % (v/v) y almacenarlas en alícuotas a -80 °C. En todo momento las mutantes estuvieron en contacto con tetraciclina (10 µg/mL), para evitar la regresión de la mutación.

Los medios de cultivos que se utilizaron durante la fase experimental para todas las cepas, fueron el mínimo base M63 (medio con glucosa, MGlu) (Miller, 1972) y otros modificados, que contenían colina/glicerol (MCGlice), colina/glucosa (MCGlu) o colina únicamente (MCol) (20 mM de cada una de las fuentes de carbono que sustituían la glucosa del medio base). La temperatura y la velocidad de agitación en el baño de incubación se mantuvieron constantes a 37 °C y 200 rpm, respectivamente.

Para confirmar la ausencia de las enzimas de interés en las mutantes, cuatro de las cepas adquiridas (dos mutantes *zwf* y dos mutantes *betB*) fueron crecidas en los medios MGlu y MCGlu para las mutantes *zwf*, y MCGlice y MCol para las mutantes *betB*. Los medios MCGlu y MCGlice se utilizaron considerando que ante la ausencia de las enzimas G6PDH y BADH, las mutantes respectivas podrían crecer utilizando colina o glicerol como fuentes alternas de carbono, respectivamente. La cepa silvestre fue cultivada simultáneamente en los

medios mencionados. La obtención de las fracciones solubles y la medición de la actividad de G6PDH y BADH se realizaron como se describe más adelante, en las secciones respectivas.

4.2 Determinación de la sensibilidad hacia el estrés oxidativo causado por H₂O₂

La concentración subletal es definida como aquella concentración de un compuesto que induce la mortalidad pero que no es estadísticamente significativa en la población experimental y que permite que el crecimiento aún ocurra (Desneux *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2009). En este caso se consideró como aquella concentración que afectó el crecimiento de las células pero que les permitió sobrevivir y continuar dividiéndose. Habiendo corroborado que las mutantes carecían de la enzima respectiva, la investigación se abocó a conocer la sensibilidad hacia el estrés oxidativo en las tres cepas. Para ello las bacterias fueron cultivadas en matraces con los medios MGlu, MCGlice y MCGlu (8 matraces de cada uno). Una vez alcanzada la fase exponencial ($Ab_{S_{600nm}}=0.5$ U), se agregó H₂O₂ (Pietersen *et al.*, 1996) en las siguientes concentraciones: 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 75 mM. Posteriormente se midió la turbidez del cultivo cada 60 minutos durante seis horas a una longitud de onda de 600 nm; este experimento fue realizado por duplicado para cada una de las cepas.

La velocidad específica de crecimiento (μ), indica el aumento en la concentración celular por unidad de tiempo. Fue calculada a partir de los datos de densidad óptica en la fase exponencial, tanto para el control como para los diferentes tratamientos con H₂O₂, utilizando la siguiente ecuación (Widdel, 2010):

$$\mu = \frac{2.303 (\log_{10} DO_2 - \log_{10} DO_1)}{(t_2 - t_1)} \quad [1]$$

Donde: DO₂ es el valor de la densidad óptica en el tiempo 2 (t_2) y DO₁ es el valor de la densidad óptica en el tiempo 1 (t_1).

Y el tiempo de duplicación (t_d), es definido como el intervalo de tiempo en el cual una población duplica su tamaño. Fue calculado a partir de la siguiente ecuación (Widdel, 2010):

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad [2]$$

Donde: μ es la velocidad específica de crecimiento [1] y $\ln 2$ es el logaritmo natural de 2.

4.3 Obtención de la fracción soluble de las células

Una vez conocida la sensibilidad de las bacterias hacia el estrés oxidativo y habiendo determinado, al menos para la cepa silvestre, que todas las concentraciones de H_2O_2 utilizadas eran subletales, ya que afectaban el crecimiento de las células pero les permitían sobrevivir y continuar dividiéndose, las diferentes cepas fueron sometidas durante 180 minutos a 0, 2.5 y 75 mM de este compuesto, en los diferentes medios (MGlu, MCGLice y MCGLu). Posteriormente, cada uno de los cultivos fue centrifugado durante diez minutos a $1,739 \times g$, el precipitado resuspendido en 1 mL amortiguador de homogeneización frío (NADP⁺ 500 μ M en Tris/HCl 50 mM, pH 7.8). Después de esto las células fueron sonicadas por 20 s a 60 W, manteniéndolas en baño de hielo, y sometidas a centrifugación durante diez minutos a $16,000 \times g$ (Velasco-García, 1999). El sobrenadante obtenido se utilizó para medir la actividad de las enzimas de interés, así como para cuantificar por duplicado la cantidad de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976).

4.4 Medición de las actividades enzimáticas

La fracción soluble de las células crecidas en los diferentes medios de cultivo fue utilizada para medir, por duplicado, la actividad de las enzimas BADH, G6PDH e IDH, siguiendo la aparición de su producto NADPH a una longitud de onda de 340 nm. La mezcla

de reacción utilizada para la BADH consistió en betaína aldehído 1mM, NADP⁺ 0.3 mM y buffer de fosfatos de potasio 100 mM pH 8.0 (Velasco-García *et al.*, 1999). Para las otras dos deshidrogenasas las mezclas de reacción utilizadas fueron una modificación de dos métodos previamente reportados. En el caso de la IDH contenía isocitrato 0.15 mM, NADP⁺ 0.6 mM, MnCl₂ 0.5 mM y Tris-HCl 100 mM (Rowe y Reeves, 1971). Mientras que para la G6PDH consistió en glucosa-6-fosfato 1 mM, NADP⁺ 0.3 mM, MgCl₂ 10 mM y Tris-HCl 100 mM pH 7.8 (Ma *et al.*, 1998). En los tres casos la reacción se llevó a cabo en un volumen total de 0.5 mL, a 30°C, y fue iniciada añadiendo 10µL del sobrenadante anteriormente obtenido. La actividad específica de todas las enzimas es expresada en la sección de resultados como miliunidades de enzima por mg de proteína (mU/mg), en donde una miliunidad equivale a la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nanomol de NADPH liberado por minuto.

4.5 Cuantificación de coenzimas

4.5.1 ENSAYO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Las bacterias fueron crecidas hasta la fase exponencial (Abs_{600nm} : 0.600) en 30 mL de medio LB; posteriormente se centrifugó durante diez minutos a 3,500 rpm y cada pastilla se resuspendió en 300µL de HCl 0.7 M, para el NADP⁺, o en 300 µL de NaOH 0.77 M, para NADPH. Se agitó vigorosamente a 50 °C durante 12 minutos para después neutralizar con 300µL de NaOH 0.77 M para la muestra extraída con HCl y con 300 µL de HCl 0.77 M para la muestra con NaOH (Lee *et al.*, 1996), seguida de la adición de 150 µL de buffer Tris-HCl 2M pH 8.0. La determinación de los niveles de las coenzimas en los extractos obtenidos se realizó utilizando el kit EnzyChrom NADP⁺/NADPH Assay Kit de Bioassay Systems, siguiendo las instrucciones del proveedor y midiendo el cambio de absorbancia a 565 nm.

4.5.2 ANÁLISIS POR HPLC

Se realizó un segundo análisis para la determinación de los niveles de NADP⁺ y NADPH, utilizando HPCL (del inglés High-Performance Liquid Chromatography). El método de extracción fue el mismo que se utilizó para el ensayo espectrofotométrico, sin embargo el buffer añadido después de la neutralización fue KH₂PO₄ 500 mM, pH 6.0. La detección de nucleótidos se realizó mediante HPLC de fase reversa, utilizando una columna SUPELCOSIL LC-18 (25 cm x 4.6 mm y 5 μM de tamaño de partícula). Se inyectaron 30 μL de las muestras y se usó un programa de gradiente que se muestra en la Tabla 1, con una fase móvil de buffer de KH₂PO₄ 100 mM pH 6.0 (A) y una mezcla de buffer de KH₂PO₄ 100 mM pH 6.0 y metanol, 90:10 (B) (SUPELCO, 1997; Murarka *et al.*, 2010). La velocidad de flujo utilizada fue de 2 mL/min y la detección se realizó siguiendo el cambio de absorbancia a 254 nm durante 18 minutos.

Tabla 1. Programa de gradiente empleado para la detección de nucleótidos por HPLC.

Tiempo (min)	% B
0	0
6	0
10	25
11.5	90
12.5	100
17	100
18	0

5.- Resultados y discusión

5.1 Confirmación de la mutación en los genes *zwf* y *betB*

En condiciones de infección, *P. aeruginosa* se enfrenta al estrés oxidativo causado por el sistema inmune (Turrens, 2003; Coiofu *et al.*, 2005; Østrup *al.*, 2010). Sin embargo, como muchos otros microorganismos, esta bacteria posee un sistema antioxidante eficiente, que abarca desde metabolitos (GSH, tioredoxina, α -cetoácidos, etc.), hasta enzimas destoxicantes (la SOD, la catalasa, GPrx y la alquil hidroxiperóxido reductasa (Ahp)) (Fig. 2) (Halliwell y Gutteridge, 2007). La actividad de estas enzimas depende del poder reductor del NADPH (Singh *et al.*, 2007). Debido a la importancia que juega el NADPH en la defensa contra el estrés oxidativo, resulta de gran importancia estudiar enzimas como la G6PDH, la cual es considerada una de las principales productoras de NADPH (Ver artículo de revisión: Singh *et al.*, 2012) y debido a diversas similitudes que la BADH tiene con ella, principalmente de tipo cinético, suponemos que la BADH podría sustituir o actuar junto con la primera en producción de NADPH, y por ende en la adaptación de *P. aeruginosa* hacia un estrés oxidativo.

Como primer paso para poner a prueba esta hipótesis, se adquirieron dos cepas de *P. aeruginosa* modificadas en el gen *zwf*, que codifica para la G6PDH, y otras dos en el gen *betB*, codificante de BADH (Jacobs *et al.*, 2003). Cabe mencionar que estas mutantes han sido caracterizadas en cuanto al sitio en el que se ha insertado el transposon ISlacZ/hah y un fenotipo inicial que adquirieron (motilidad y crecimiento prototrófico); sin embargo, falta caracterizarlas de manera más profunda para conocer si verdaderamente carecen de la proteína cuyo gen fue modificado. Con el fin de corroborar que estas cepas de *P. aeruginosa* tenían las mutaciones en los genes mencionados, las bacterias fueron crecidas en medios que contenían las fuentes de carbono que utilizan las vías metabólicas en las que participan los productos de estos genes, es decir, las enzimas G6PDH y BADH. En el caso de las mutantes *zwf* se encontró

que únicamente una de ellas tenía un crecimiento menor en los medios utilizados (MCGlu y MGlu), en comparación con la cepa silvestre (Tabla 2); los ensayos de actividad enzimática demostraron que la cepa con menor crecimiento también carece de la actividad de G6PDH, en los dos medios de cultivo utilizados, como se discute posteriormente en el apartado 5.3. En el caso de las dos mutantes *betB* cultivadas en MCol y MCGlice, ambas mostraron un crecimiento nulo en el primero de los medios y el mismo crecimiento en el segundo, al compararla con la cepa silvestre (Tabla 2). Esta característica de las mutantes *betB* para crecer en medio MCGlice fue aprovechada para investigar si carecían de la actividad de BADH, los resultados encontrados (no mostrados) demostraron que, a diferencia de la cepa silvestre, las dos mutantes *betB* no poseen actividad de BADH.

Tabla 2. Crecimiento de las cepas silvestre y las mutantes *zwf* y *betB*, de *P. aeruginosa* en medios de cultivo con diferente fuente de carbono.

Cepa	Medio de cultivo		Cepa	Medio de cultivo	
	MCol	MCGlice		MGlu	MCGlu
silvestre	++	+++	silvestre	+++	+++
PW10061(<i>betB</i>)	—	+++	PW6325(<i>zwf</i>)	+++	+++
PW10062(<i>betB</i>)	—	+++	PW6326(<i>zwf</i>)	++	++

La información antes mostrada confirma que las mutaciones esperadas se realizaron exitosamente en una de las cepas *zwf* y en ambas cepas *betB*, una de estas últimas (PW10061) fue seleccionada para realizar, junto con la cepa silvestre y la mutante *zwf* carente de G6PDH (PW6326), el resto de los experimentos. Los resultados obtenidos también indican que la mutante *zwf* puede metabolizar la glucosa en ausencia de la enzima G6PDH. Una vía alterna a la de Entner-Doudoroff es la conversión extracelular de la glucosa a gluconato o 2-cetogluconato o hasta 2-cetogluconato (Fig. 3). Estas reacciones están presentes en diferentes

especies del género *Pseudomonas* y tienen como resultado la formación de gluconato-6-fosfato, sin producción de NADPH en el primero de los casos, o hasta con gasto de esta coenzima en el segundo. El gluconato-6-fosfato sirve como sustrato para la gluconato-6-fosfato deshidratasa (*edd*) y posteriormente para la 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa (*eda*) (Fig. 3) (Fuhrer *et al.*, 2005; Del Castillo *et al.*, 2007).

Como ya se mencionó, las mutantes *betB* no crecieron en el medio MCol pero sí en el medio MCGlice. Esta característica se debe a que el metabolismo de la colina involucra directamente la participación de la BADH (Velasco-García *et al.*, 1999; Wargo *et al.*, 2008), por ello las mutantes *betB* al estar carentes de esta proteína no crecieron en un medio mínimo con colina como única fuente de carbono y nitrógeno. Esto demuestra que la vía de degradación de la colina es única y, que probablemente no existen vías alternas de asimilación de este compuesto, por lo que al estar interrumpida en uno de sus componentes enzimáticos, *P. aeruginosa* se queda sin fuente de carbono y por lo tanto de energía. Sin embargo, en un medio con colina y glicerol (MCGlice), las mutantes *betB* pueden utilizar el glicerol como fuente de carbono, ya que la vía de degradación del mismo es funcional.

5.2 Respuesta al estrés oxidativo bajo diferentes fuentes de carbono

Seleccionadas las cepas que carecían de las actividades de G6PDH y de BADH, se procedió a investigar si la fuente de carbono, o el metabolismo de ésta, influyen en la tolerancia al estrés oxidativo. Se utilizaron para ello el medio MGlu, que semeja un ambiente al que seguramente se enfrenta continuamente este microorganismo, y en el que participaría la G6PDH en la producción de NADPH (Fig. 3); el medio MCGlice, que contiene las fuentes de carbono y nitrógeno que teóricamente utiliza la bacteria en el pulmón después de degradar la fosfatidilcolina, y en donde la BADH sintetizaría la coenzima mencionada (Fig. 1); y un tercer

medio, MCGlu, que aunque desconocemos el sitio en donde la bacteria podría encontrar simultáneamente estas dos fuentes de carbono, en nuestro estudio podría ayudarnos a conocer si la participación conjunta de G6PDH y BADH, como productoras de NADPH, podría llevar a una mayor tolerancia hacia el estrés oxidativo.

Los primeros experimentos fueron realizados con la cepa silvestre creciendo en los medios mencionados y utilizando H₂O₂ en un intervalo de concentración de 0 a 75 mM (Fig. 4). Como puede observarse, el mejor crecimiento de *P. aeruginosa* se presenta en los medios con glucosa (MGlu y MCGlu, Fig. 4A y 4C), lo que muestra la preferencia que tiene el microorganismo por este carbohidrato como fuente de carbono, con respecto al medio con colina y glicerol. En forma contraria, el cultivo creciendo en MCGlice (Fig. 4B), presenta un crecimiento pobre que se caracteriza por un lento reinicio de la fase exponencial del cultivo. A pesar de esto, la tolerancia de la bacteria a concentraciones altas de H₂O₂ no es tan notoria en el medio que únicamente contiene glucosa (MGlu) como en los que incluyen a la colina (MCGlice y MCGlu, Fig. 4B y 4C), en los que la fase exponencial de crecimiento en los cultivos reinicia antes, en las concentraciones mencionadas del compuesto estresante; estos resultados sugieren que la vía de degradación de la colina, en la que actúa la enzima BADH, podría tener una mayor participación en el proceso de adaptación de *P. aeruginosa* hacia el estrés oxidativo. Otro aspecto que también se observa en la Fig. 4, es que de los medios con colina, MCGlu, es el que permite una más rápida y mejor recuperación del crecimiento, lo que sugiere un efecto sinérgico, posiblemente de la G6PDH y la BADH, cuando la colina y la glucosa están presentes.

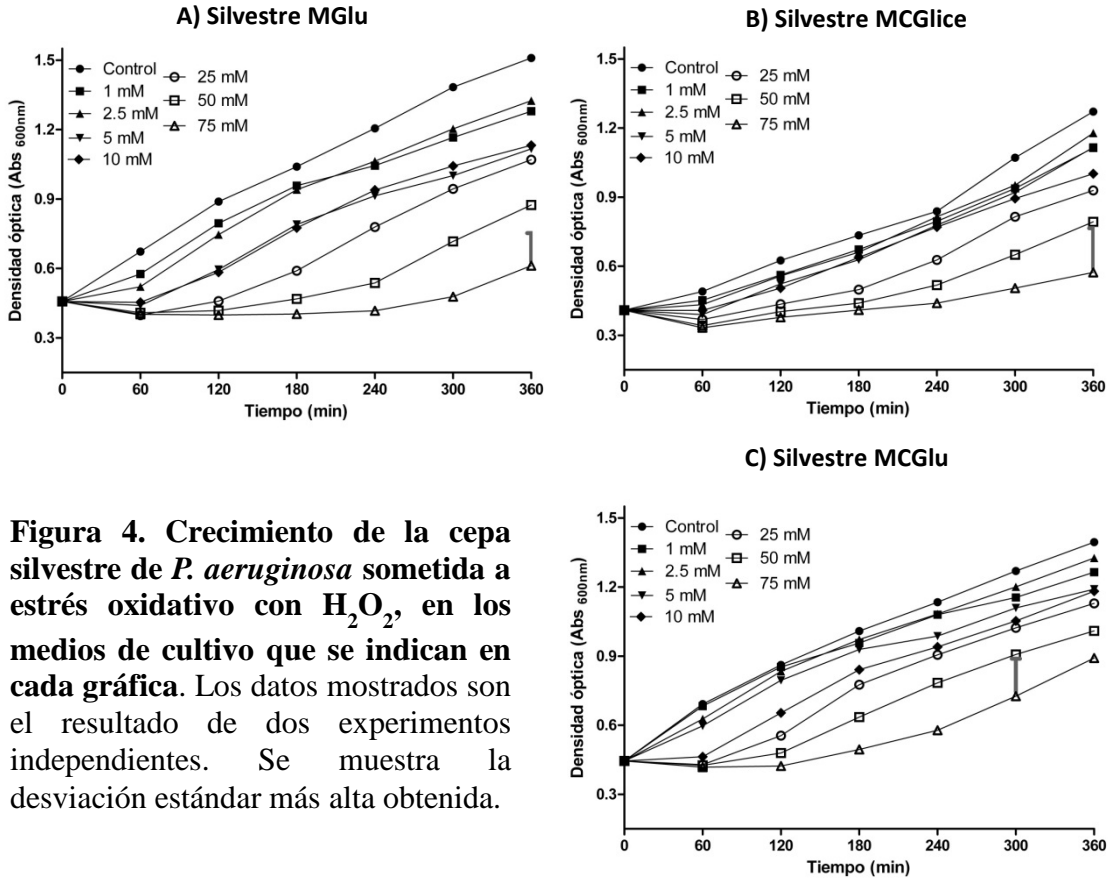


Figura 4. Crecimiento de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* sometida a estrés oxidativo con H_2O_2 , en los medios de cultivo que se indican en cada gráfica. Los datos mostrados son el resultado de dos experimentos independientes. Se muestra la desviación estándar más alta obtenida.

Considerando que en ausencia de H_2O_2 la bacteria tiene una velocidad de crecimiento diferente en las distintas fuentes de carbono utilizadas (Tabla 3), y con la finalidad de apreciar mejor la respuesta adaptativa de la bacteria hacia la condición estresante, en la Fig. 5 se muestra el porcentaje de crecimiento alcanzado a las 6 horas de haber iniciado el estrés, en los distintos medios de cultivo. Los datos muestran que a bajas concentraciones de H_2O_2 no existen diferencias en las medias de los valores, en la respuesta que presenta la cepa silvestre en los tres medios utilizados. Sin embargo, a concentraciones más elevadas de H_2O_2 (50 y 75 mM), es más evidente que en el medio MCGlu, en el que podrían estar participando las enzimas G6PDH y BADH, existe una mayor tolerancia al estrés oxidativo en relación a los otros dos medios.

Tabla 3. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* en los medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono en condiciones de estrés oxidativo con H_2O_2 . Se muestran los valores en los que se observaron las diferencias más notorias. Los valores son presentados como el promedio \pm desviación estándar.

Medio de cultivo	Control	10 mM	25 mM*	50 mM*	75 mM*
MCGlice μ (h^{-1})	0.209 \pm 0.04	0.189 \pm 0.03	0.209 \pm 0.02	0.197 \pm 0.03	0.123 \pm 0.06
t_d (h)	3.38 \pm 0.69	3.72 \pm 0.67	3.34 \pm 0.45	3.58 \pm 0.67	6.63 \pm 3.66
MGlu μ (h^{-1})	0.242 \pm 0.1	0.227 \pm 0.009	0.212 \pm 0.006	0.206 \pm 0.03	0.178 \pm 0.08
t_d (h)	2.86 \pm 0.14	3.06 \pm 0.13	3.27 \pm 0.10	3.41 \pm 0.53	4.36 \pm 2.04
MCGlu μ (h^{-1})	0.274 \pm 0.02	0.180 \pm 0.09	0.233 \pm 0.01	0.189 \pm 0.02	0.201 \pm 0.01
t_d (h)	2.54 \pm 0.23	4.37 \pm 2.12	2.98 \pm 0.17	3.70 \pm 0.37	3.45 \pm 0.20

*Se utilizaron los datos de la fase de recuperación.

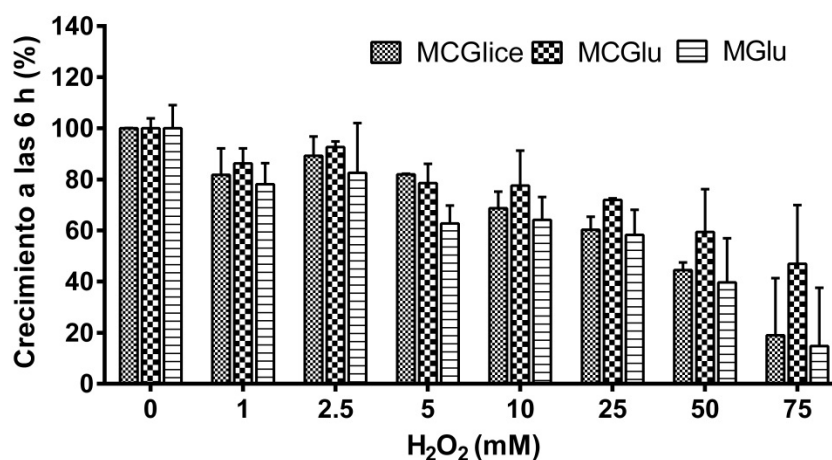


Figura 5. Porcentaje de crecimiento en la cepa silvestre después de exponerla 6 horas a diferentes concentraciones de H_2O_2 , en las tres fuentes de carbono. Los datos mostrados son el resultado de dos experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

Considerando la posibilidad de que el mayor crecimiento obtenido en los medios con colina fuese debida a una inestabilidad del H_2O_2 , y por ende a una disminución en su concentración. Se decidió valorar si a lo largo de 6 h existían cambios en una concentración de

75 mM de H_2O_2 en los medios MCGlice y MGlu, sin bacterias, siguiendo la absorbancia de este compuesto a 240 nm (Li y Schellhorn, 2007). Las gráficas de la Fig. 6 demuestran que en los medios utilizados (MGlu y MCGlice), la concentración de H_2O_2 no presenta cambios drásticos a lo largo de las 6 h, siendo el medio con colina y glicerol (MCGlice) el que presentó la mayor disminución, 9.1%, en la concentración del compuesto. A pesar de esto, consideramos que la pérdida de H_2O_2 encontrada no es suficiente como para concluir que la mayor velocidad en el crecimiento podría deberse a una disminución en la concentración del compuesto, atribuible a su inestabilidad en el medio con colina y glicerol, que es el medio que presentó los valores más bajos de μ , en comparación con los otros dos (Tabla 3). Sin embargo, no podemos descartar que las bacterias contribuyeran a una disminución en la concentración del H_2O_2 , vía la secreción de enzimas degradantes de este compuesto.

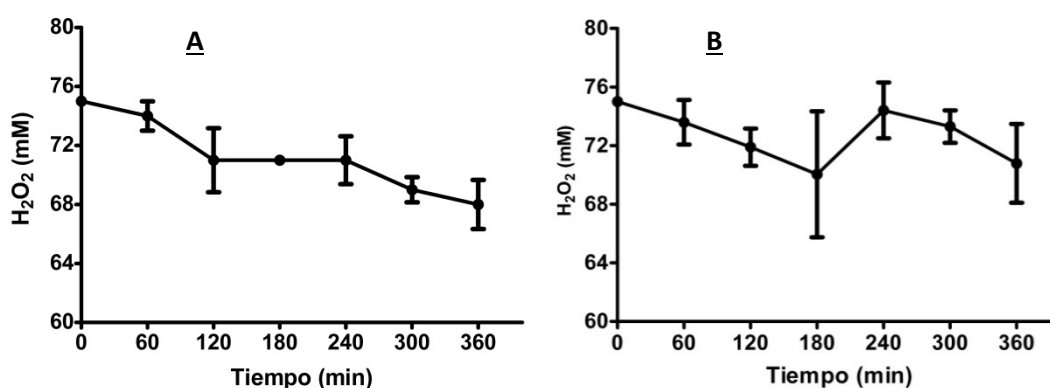


Figura 6. Estabilidad del H_2O_2 , a lo largo de 6 horas que duraron los experimentos, en los medios MCGlice (A) y MGlu (B). Los datos mostrados son la media de tres experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

Tomando en cuenta que en la cepa silvestre la tolerancia al estrés oxidativo, principalmente a más elevadas concentraciones de H_2O_2 (50 y 75 mM), pudiera estar relacionada con la fuente de carbono utilizada, se consideró que las mutantes *zwf* y *betB*, carentes de la G6PDH y la BADH, respectivamente, podrían ser más susceptibles al estrés

oxidativo al no contar con los niveles del NADPH necesarios para combatir el estrés oxidativo. Para corroborar esta hipótesis, se valoró la susceptibilidad de las mutantes *zwf* y *betB* al estrés oxidativo creciendo la primera de ellas en los medios MCGlu y MGlu y a la segunda en MCGlu y MCGlice. En la cepa silvestre el medio MCGlu, utilizado en ambas mutantes, llevaría a la participación de la G6PDH y la BADH en la degradación de las fuentes de carbono utilizadas (glucosa y colina), mientras que MGlu y MCGlice promoverían la participación de la primera y la segunda de las enzimas mencionadas, respectivamente.

En el caso de la mutante *zwf* crecida en MGlu (Fig. 7A) existe una menor velocidad específica de crecimiento (μ), con relación al de la cepa silvestre, en el control así como las concentraciones de H₂O₂ superiores a 10 mM (Tabla 4), sugiriendo una mayor susceptibilidad a la primera hacia el estrés aplicado; sin embargo, si comparamos los porcentajes en los que ambas cepas reducen su crecimiento, con respecto al control respectivo (0 mM de H₂O₂), después de 6 h de tratamiento con las diferentes concentraciones de H₂O₂, se observa una tendencia similar en el comportamiento de crecimiento (Fig. 8A). La reducción en la velocidad de crecimiento de la mutante *zwf* en MGlu podría deberse a que, al interrumpir la vía principal de degradación de la glucosa (Vía de Entner-Doudoroff) por la carencia de la G6PDH, y por lo tanto la formación del metabolito clave gluconato-6-fosfato, la degradación de glucosa por medio de las vías alternas, podría ser menos eficiente, ya que se ha demostrado que en *P. fluorescens* y en *P. putida*, el consumo de carbono en un medio mínimo con glucosa ocurre principalmente vía la fosforilación de la glucosa (Fuhrer *et al.*, 2005). No obstante, debemos considerar que el aprovechamiento de la glucosa por vías alternas garantiza la utilización de la fuente de carbono (Del Castillo *et al.*, 2007).

Tabla 4. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) de la cepa silvestre y la mutante *zwf* de *P. aeruginosa* en MGLu, bajo un estrés oxidativo con H_2O_2 . Se muestran los valores en los que se observaron las diferencias más notorias. Los valores son presentados como el promedio \pm desviación estándar.

Cepa		Control	10 mM	25 mM*	50 mM*	75 mM*
silvestre	μ (h^{-1})	0.242 \pm 0.1	0.227 \pm 0.009	0.212 \pm 0.006	0.206 \pm 0.03	0.178 \pm 0.08
	t_d (h)	2.86 \pm 0.14	3.06 \pm 0.13	3.27 \pm 0.10	3.41 \pm 0.53	4.36 \pm 2.04
Mutante <i>zwf</i>	μ (h^{-1})	0.164 \pm 0.05	0.157 \pm 0.05	0.110 \pm 0.04	0.112 \pm 0.05	0.072 \pm 0.001
	t_d (h)	4.48 \pm 1.47	4.66 \pm 1.55	6.60 \pm 2.09	6.85 \pm 3.02	9.57 \pm 0.17

*Se utilizaron los datos de la fase de recuperación.

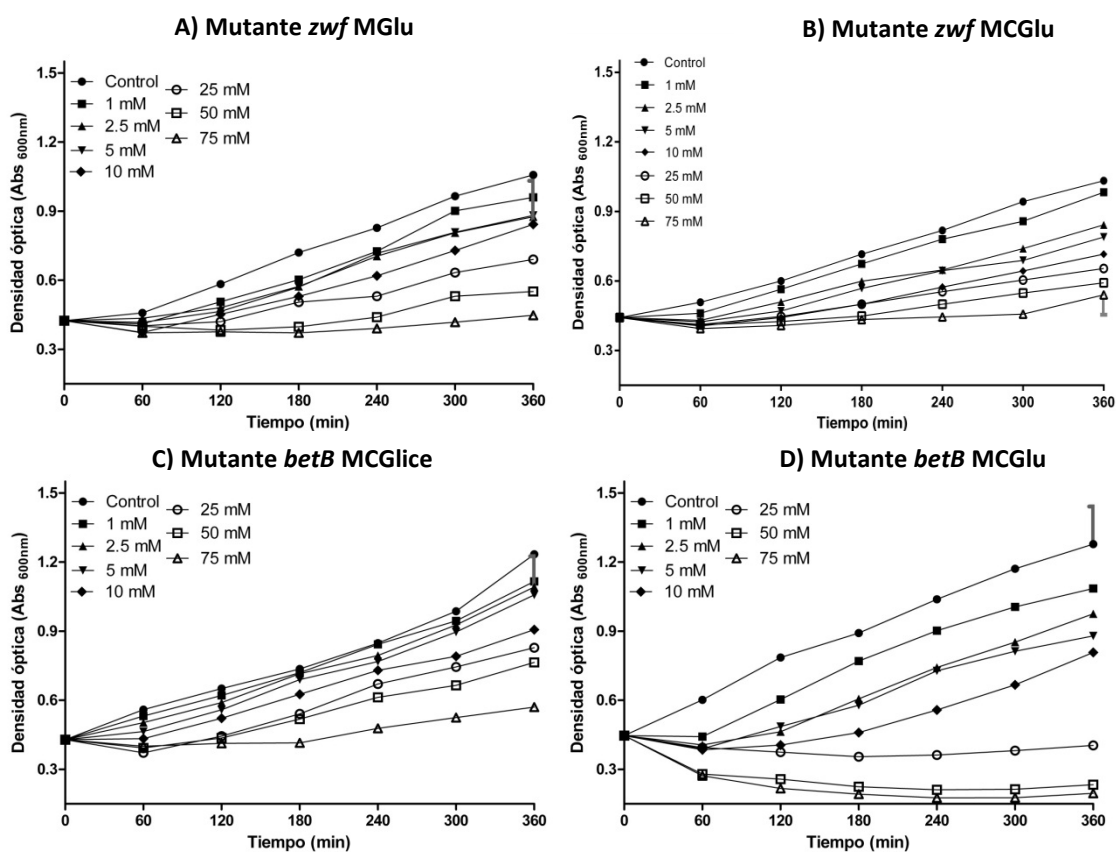


Figura 7. Crecimiento de las cepas mutantes *zwf* y *betB* de *P. aeruginosa* sometidas a estrés oxidativo con H_2O_2 , en los medios de cultivo que se indican. Los datos mostrados son el resultado de dos experimentos independientes. Se muestra la desviación estándar más alta obtenida.

Un aspecto interesante que resulta del análisis de la Fig. 8A, es que en la mutante *zwf* presenta una tendencia de mayor sensibilidad que la cepa silvestre a altas concentraciones de H_2O_2 (25, 50 y 75 mM). Estos resultados son similares a lo reportado por Ma y colaboradores (1998), quienes mencionan una modesta sensibilidad al paraquat en una mutante que también carece del gen *zwf*. Nuestros resultados podrían sugerir una cierta participación de la G6PDH, debido a la producción de NADPH, en la tolerancia al estrés oxidativo generado por concentraciones superiores a 10 mM de H_2O_2 .

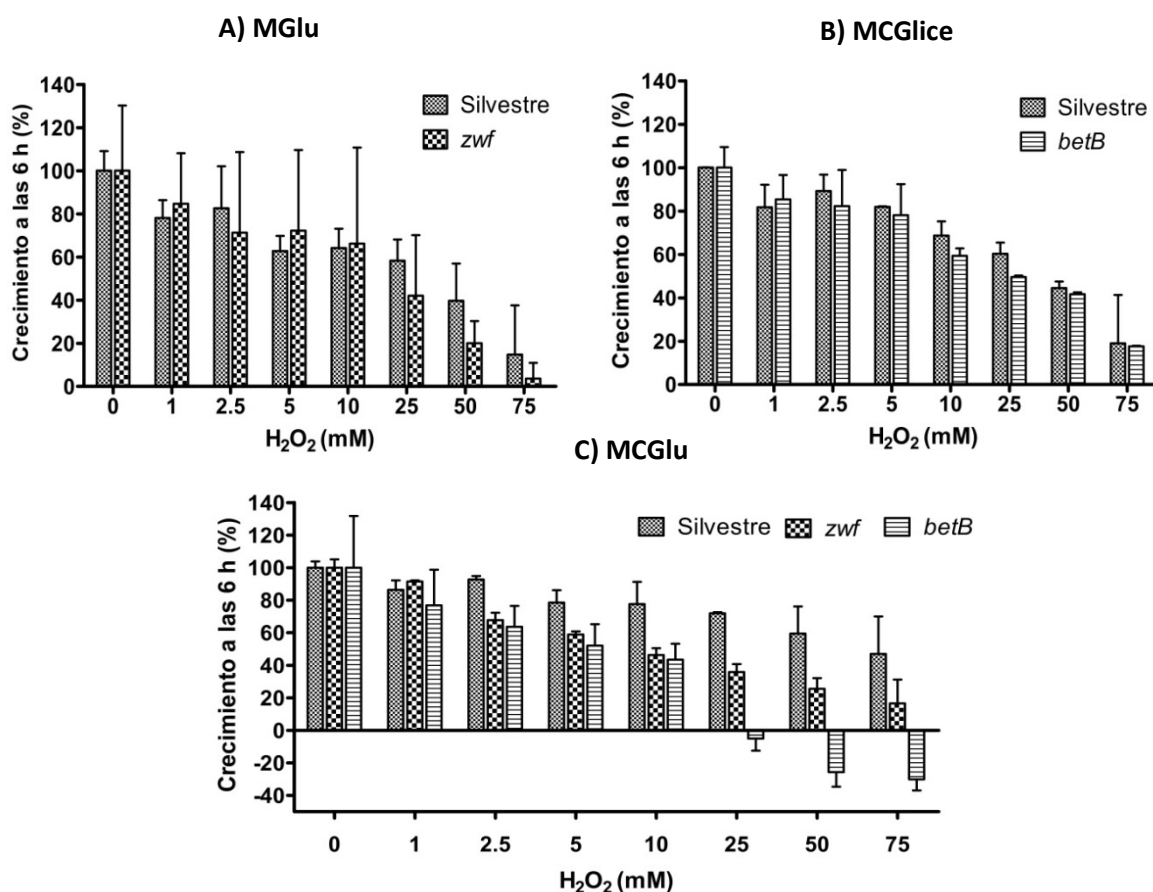


Figura. 8. Comparación del crecimiento alcanzado por la cepa silvestre y las mutantes *betB* y *zwf*, después de exponerlas 6 horas a diferentes concentraciones de H_2O_2 en los medios MGLu (A), MCGLice (B) y MCGLu (C). En el caso del medio MCGLu (C) en la mutante *betB* los valores de crecimiento en 50 y 75 mM de H_2O_2 , son negativos porque están por debajo del valor de absorbancia en el cual se indujo el estrés oxidativo. Los datos mostrados son el resultado de dos experimentos independientes. Las barras de error indican la desviación estándar.

Tabla 5. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) en la cepa silvestre y la mutante *betB* de *P. aeruginosa* en MCGlice, bajo un estrés oxidativo con H_2O_2 . Se muestran los valores en los que se observaron las diferencias más notorias. Los valores son presentados como el promedio \pm desviación estándar.

Cepa		Control	10 mM	25 mM*	50 mM*	75 mM*
silvestre	μ (h^{-1})	0.209 \pm 0.04	0.189 \pm 0.03	0.209 \pm 0.02	0.197 \pm 0.03	0.123 \pm 0.06
	t_d (h)	3.38 \pm 0.69	3.72 \pm 0.67	3.34 \pm 0.45	3.58 \pm 0.67	6.63 \pm 3.66
Mutante <i>betB</i>	μ (h^{-1})	0.190 \pm 0.006	0.162 \pm 0.02	0.169 \pm 0.03	0.154 \pm 0.02	0.130 \pm 0.02
	t_d (h)	3.65 \pm 0.12	4.31 \pm 0.63	4.18 \pm 0.85	4.54 \pm 0.65	5.41 \pm 0.94

*Se utilizaron los datos de la fase de recuperación.

A pesar de que en la mutante *betB* la μ es menor, y por lo tanto el t_d es mayor, en comparación con la cepa silvestre en MCGlice (Tabla 5), el crecimiento de ambas cepas es similar (Figs. 7C y 4B). Además, los porcentajes en los que ambas reducen su crecimiento respecto a su control respectivo (con 0 mM de H_2O_2), también es similar (Fig. 8B). A partir de estos resultados se podría sugerir que dicho gen y por ende la BADH, no son importantes en la tolerancia al estrés oxidativo. Sin embargo, como ya se mencionó, se sabe que la mutante *betB* puede utilizar el glicerol como fuente de carbono, por lo que en ella podrían estar participando los genes *glp*, que codifican para las proteínas requeridas para el transporte y la conversión del glicerol a dihidroxiacetona fosfato, que es posteriormente metabolizada por una rama de la vía de Entner-Doudoroff, dando como resultado gliceraldehído-3-fosfato o triosa fosfato, que son metabolizados hasta piruvato (Heath y Gaudy, 1978) (Fig. 9). De esta manera, como se sugiere más adelante, consideramos que la célula podría obtener la energía necesaria para mantener un buen crecimiento y, combatir el estrés oxidativo (Fig. 7C). Previamente, se ha mencionado la importancia del glicerol para *P. aeruginosa* en las infecciones pulmonares, al ser utilizado como fuente de carbono durante la degradación de la FC (Schweizer y Po, 1996; Son *et al.*,

2007), principal componente del surfactante pulmonar. Además, se ha demostrado que el gliceraldehído-3-fosfato es un intermediario obligatorio para la biosíntesis del alginato (Banerjee *et al.*, 1983), expolisacárido que es reconocido como un factor de virulencia de esta bacteria (May *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que la vía de degradación del glicerol podría ser de gran importancia para la bacteria, ya que en la mutante *betB*, la BADH ni la G6PDH están participando en la biosíntesis de la coenzima reductora.

En el catabolismo del glicerol, participan dos enzimas productoras de NADPH (Fig. 9). La G3PDH, que es una enzima inducible por el glicerol en *P. aeruginosa* PAO (Heath y Gaudy, 1978; McCowen *et al.*, 1981). Y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), de la cual *P. aeruginosa* PAO posee dos isoformas, que difieren en la dependencia del cofactor, una de ellas utiliza al NAD^+ y la otra al NADP^+ (Rivers y Blevins, 1987). En *P. putida* se encontró que cuando la bacteria es crecida en un medio mínimo con glucosa o glicerol como única fuente de carbono, en el primer caso se inducía la actividad de la GAPDH- NAD^+ con respecto a la isoforma dependiente de NADP^+ , sin embargo, cuando la fuente de carbono es glicerol, hay un considerable incremento en la actividad de la GAPDH- NADP^+ , aunque la actividad de la isoforma dependiente de NAD^+ sigue siendo la predominante (Nikel *et al.*, 2014). Esta información sugiere que cuando la fuente de carbono incluye al glicerol, la G3PDH y la GAPDH-dependiente de NADP^+ podrían participar como productoras de NADPH para combatir el estrés oxidativo.

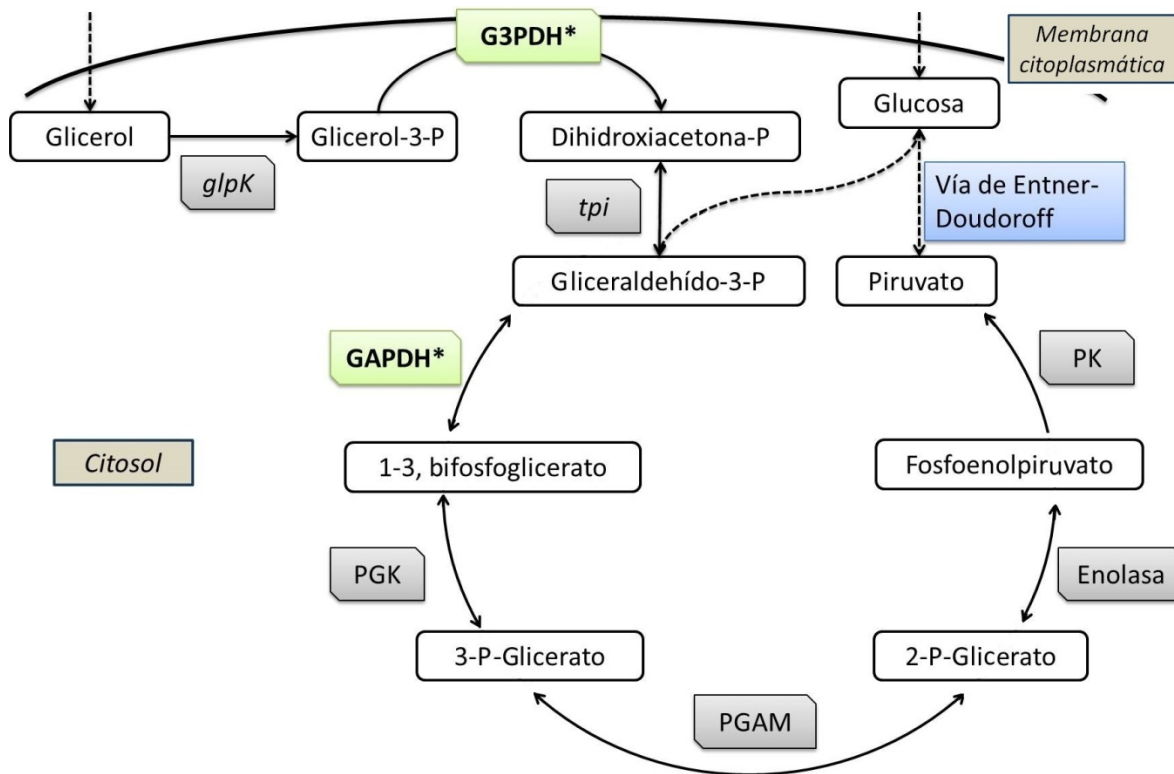


Figura 9. Metabolismo del glicerol en *P. aeruginosa*. *glpK*: glicerol cinasa; G3PDH: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; *tpi*: triosafosfato isomerasa; GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; PGK: fosfoglicerato cinasa; PGAM: fosfoglicerol mutasa; PK: piruvato cinasa. *Enzimas productoras de NADPH. Las flechas punteadas indican una serie de reacciones no mostradas.

Con relación al crecimiento de las mutantes *zwf* y *betB* en MCGlu, un medio en el que la cepa silvestre mostró una mayor tolerancia al H_2O_2 (Fig. 4C) y en el que estarían participando las enzimas G6PDH y BADH en la producción de NADPH, ambas cepas mostraron comportamientos distintos al de la cepa silvestre. En el crecimiento de la primera (Fig. 7B), aún en ausencia de H_2O_2 , los valores de μ fueron menores en relación con la cepa silvestre (Tabla 6), y es más sensible al estrés oxidativo causado por H_2O_2 (Fig. 8C), esta información sugiere que la G6PDH si parece estar participando en la tolerancia hacia el estrés oxidativo; sin embargo, su papel no pareciera ser tan esencial. Este comportamiento sugiere que las vías alternas de catabolismo de la glucosa (Fig. 3) no son tan eficientes, pues *P.*

aeruginosa no puede combatir adecuadamente el estrés oxidativo debido a la interrupción en uno de los componentes enzimáticos de la vía de Entner-Doudoroff.

Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) en la cepa silvestre y las mutantes *zwf* y *betB* de *P. aeruginosa* en MCGlu, bajo un estrés oxidativo con H_2O_2 . Se muestran los valores en los que se observaron las diferencias más notorias. Los valores son presentados como el promedio \pm desviación estándar.

Medio de cultivo	Control	10 mM	25 mM*	50 mM*	75 mM*
silvestre μ (h^{-1})	0.274 \pm 0.02	0.180 \pm 0.09	0.233 \pm 0.01	0.189 \pm 0.02	0.201 \pm 0.01
t_d (h)	2.54 \pm 0.23	4.37 \pm 2.12	2.98 \pm 0.17	3.70 \pm 0.37	3.45 \pm 0.20
Mutante μ (h^{-1})	0.146 \pm 0.002	0.126 \pm 0.005	0.100 \pm 0.001	0.099 \pm 0.01	0.096 \pm 0.01
<i>zwf</i> t_d (h)	4.74 \pm 0.08	5.49 \pm 0.23	6.90 \pm 0.14	7.09 \pm 1.02	7.26 \pm 0.76
Mutante μ (h^{-1})	0.201 \pm 0.009	0.193 \pm 0.01	—	—	—
<i>betB</i> t_d (h)	3.44 \pm 0.15	3.61 \pm 0.33	—	—	—

*Se utilizaron los datos de la fase de recuperación.

—: Valores que no se calcularon, pues no había crecimiento.

Por otro lado, en el mismo medio MCGlu, la mutante *betB* mostró buen crecimiento hasta la concentración de 10 mM de H_2O_2 (Fig. 7D y Tabla 6); sin embargo, en las concentraciones más altas (25-75 mM), se observa una hipersensibilidad a éste, resultando en una lisis celular, que se presenta como una disminución en la turbidez del cultivo o en su absorbancia en 600 nm (Fig. 8C). Estos resultados pueden ser explicados en parte porque la carencia de la BADH en la mutante *betB*, conlleva a un efecto tóxico causado por la acumulación de la betaína aldehído (BA) como Sage y colaboradores (1997) mencionan. Sin embargo, en los experimentos realizados en este trabajo, la acumulación de BA no pareciera tener este efecto tóxico, aparentemente esto está relacionado con la fase de crecimiento, pues en un cultivo de la mutante *betB* en MCGlu, en el que se inició el estrés en una etapa posterior

del crecimiento (Abs_{600nm} : 0.580 unidades de absorbancia), no se observa hipersensibilidad a altas concentraciones de H_2O_2 (resultados no mostrados). Esta información sugiere que la carencia de la BADH, la ausencia del osmoprotector GB o la vía de degradación de este osmoprotector hacen más sensibles a la bacteria al estrés oxidativo. Relacionado con esta posibilidad, recientemente se le atribuyó otro papel diferente al de osmoprotector a GB, pues se demostró que juega un papel regulador de la expresión de varios genes vía el regulador transcripcional GbdR, que está implicado en la adquisición y transporte de la colina así como el catabolismo de GB a piruvato (Hampel *et al.*, 2014). Esta información sugiere que posiblemente, la vía en la que participa la BADH o alguno de sus intermediarios, como GB, participan en la tolerancia al estrés oxidativo, como se ha demostrado para microorganismos como la levadura (Liu *et al.*, 2011; Sui *et al.*, 2012). Cabe resaltar que, aunque desconocemos la razón, la hipersensibilidad al estrés oxidativo no se observa cuando la mutante *betB* es crecida en un medio que también contiene glicerol (MCGlice) (Fig. 7C).

Interesantemente, a diferencia de la cepa silvestre, las mutantes bajo estrés oxidativo, no mostraron la recuperación en el crecimiento en las últimas horas, excepto en la mutante *betB* en MCGlice (Fig. 7C), lo que apoya el que esta vía o alguno de sus componentes podría involucrarse en la tolerancia al estrés por H_2O_2 , principalmente a las concentraciones más elevadas de este compuesto (50 y 75 mM), en donde el metabolismo de glucosa no parece brindar este soporte a la bacteria (Fig. 7D). Tocante a esto, en *Saccharomyces cerevisiae* se ha relacionado la síntesis del glicerol en la respuesta al estrés oxidativo, pues se ha postulado que sirve para generar NADPH (Godon *et al.*, 1998; Pählman *et al.*, 2001) o como depurador (*scavenger* en inglés) de radicales $\cdot OH$ (Smirnoff y Cumbes, 1989). Además, se ha mencionado que el glicerol puede generar grandes cantidades de NADPH mediante un

ciclamiento enzimático de glicerol a dihidroxiacetona, funcionando como una transhidrogenasa, como respuesta al estrés osmótico (Norbeck y Blomberg, 1997). Una situación similar podría estar ocurriendo en *P. aeruginosa*, ya que existen reportes de que el metabolismo de glicerol involucra a la enzima G3PDH (Heath y Gaudy, 1978; McCowen *et al.*, 1981) que podría estar produciendo NADPH y de esta manera ayudar a combatir el estrés oxidativo. Esta es una de las enzimas cuyo gen se ha encontrado, junto con los de otras enzimas involucradas en el metabolismo de FC, entre las que se encuentra la BADH, que se inducen tanto *in vivo* como *in vitro* por la presencia de este fosfolípido (Son *et al.*, 2007).

5.3 Efecto de la fuente de carbono en la actividad de las principales enzimas productoras de NADPH, bajo un estrés oxidativo

El NADPH es una coenzima que por sus propiedades reductoras, contribuye a mantener el estado redox de la célula (Pollak *et al.*, 2007). Cuando la célula se enfrenta a un estado en el que la generación de radicales libres, es decir, las ROS y del nitrógeno, es mayor a la detoxificación de los mismos, se dice que se encuentra bajo un estrés oxidativo (Lushchak, 2001). En esta situación participan las enzimas antioxidantes (la SOD, la catalasa y la GPrx,) que, de forma directa o indirecta, son dependientes del poder reductor proporcionado por el NADPH (Singh *et al.*, 2007), e incluso pueden utilizar el cofactor NADPH para su actividad catalítica (la GR y la Ahp) (Ochsner *et al.*, 2000; Costa e Imlay, 2001; Halliwell y Gutteridge, 2007). Además, el NADPH puede ser utilizado para reducir el GSSG a GSH, metabolito antioxidante muy importante para mantener el balance redox de la célula (Fig. 2) (Halliwell y Gutteridge, 2007), o también puede ser usado por la catalasa, para prevenir la formación del compuesto II (estado inactivo de la catalasa) (Kirkman y Gaetani, 1984; Jouve *et al.*, 1986; Kirkman *et al.*, 1987, Hillar *et al.*, 1994; Kirkman *et al.*, 1999; Gaetani *et al.*, 2005). Debido a esto, se considera que en condiciones de estrés oxidativo, el NADPH, y por

ende las enzimas que lo sintetizan, podrían ser un factor importante en la tolerancia al mismo. Para probar esta hipótesis, en este trabajo se midió la actividad de las enzimas BADH, G6PDH e IDH-NADP⁺ en *P. aeruginosa*. En este trabajo se decidió medir la actividad de la enzima IDH-NADP⁺, pues en investigaciones relacionadas con el estrés oxidativo se ha encontrado que su actividad incrementa (Jo *et al.*, 2001; Middaug *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Bériault *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007). Para ello se creció a la bacteria durante tres horas en presencia del estrés oxidativo, con una concentración subletal de H₂O₂ (aquella que afecta las células pero que les permite sobrevivir y continuar dividiéndose) o con la concentración más alta de este compuesto manejada en experimentos previos (75 mM); los medios de cultivo utilizados fueron los que se han venido mencionando (MGlu, MCGlu y MCGLice).

Los datos presentados en la Fig. 10, muestran que la actividad de la G6PDH en la cepa silvestre, así como en la mutante *betB* (Fig. 11C y D) sometidas a estrés oxidativo en los diferentes medios no varían en forma considerable. Esto es un resultado inesperado e interesante, pues se ha documentado de manera extensa la participación de dicha enzima en el estrés oxidativo en diferentes tipos de células de mamíferos (Scott *et al.*, 1991; Scott *et al.*, 1993; Pandolfi *et al.*, 1995; Preville *et al.*, 1999; Salvemini *et al.*, 1999), *Candida albicans* (González-Parrága *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006), *S. cerevisiae* (Izawa *et al.*, 1998; Krems, *et al.*, 1995; Juhnke *et al.*, 1996), *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* (Greenberg *et al.*, 1990; Lundberg *et al.*, 1999; Giró *et al.*, 2006), *P. fluorescens* (Singh *et al.*, 2005; Bériault *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007) e incluso en *P. aeruginosa* se ha reportado que la carencia de este gen, incrementa modestamente la sensibilidad al paraquat (Ma *et al.*, 1998). Sin embargo, en este trabajo los datos obtenidos de las actividades enzimáticas y el crecimiento de la mutante *zwf*, sugieren que la G6PDH pareciera no ser una enzima esencial en la tolerancia al estrés oxidativo causado por H₂O₂ *in vitro* en *P. aeruginosa*. Estos resultados son similares a lo

reportado en *Cryptococcus neoformans*, pues en esa investigación encontraron que la mutante *zwf* no era sensible al estrés oxidativo provocado con H_2O_2 , que no existían cambios en la expresión de ARN_m ni diferencias en los niveles de NADPH en comparación con las células no estresadas, por lo que proponen un modelo de producción de NADPH por medio de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (vía de las pentosas fosfato) (Brown *et al.*, 2010). Un mecanismo similar a este podría estar ocurriendo en *P. aeruginosa*, en la que posiblemente otras enzimas relacionadas con la biosíntesis de NADPH, por ejemplo la IDH- $NADP^+$, como se explica más adelante, o alguna enzima relacionada con el metabolismo del glicerol, proveen de NADPH a la célula.

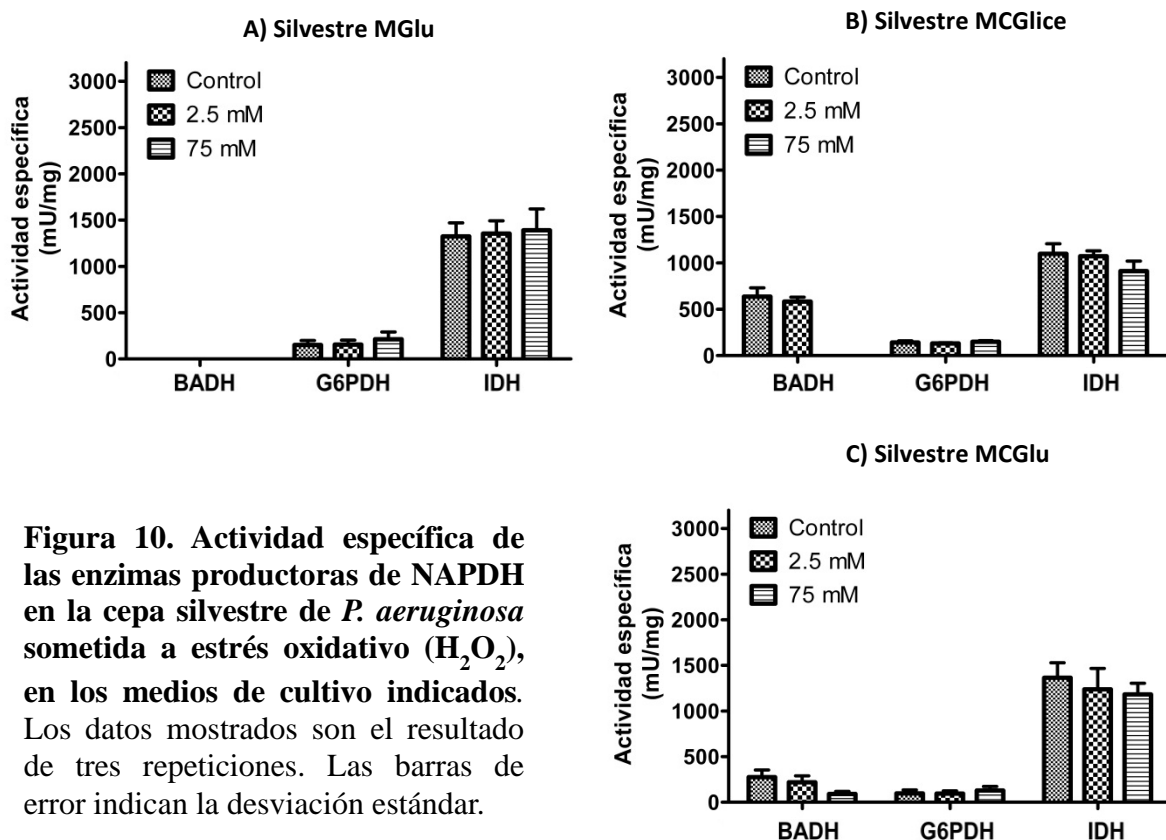


Figura 10. Actividad específica de las enzimas productoras de NADPH en la cepa silvestre de *P. aeruginosa* sometida a estrés oxidativo (H_2O_2), en los medios de cultivo indicados. Los datos mostrados son el resultado de tres repeticiones. Las barras de error indican la desviación estándar.

En lo que respecta a la enzima BADH, que no se expresa en las células crecidas en MGlucose, presentó la máxima actividad específica en las crecidas en MCGlycerol, y un 43.37% de

ésta en las de MCGLu, en ausencia de H₂O₂ (Fig. 10), lo que indica que el gen *betB* es inducido por colina y reprimido catabólica y parcialmente por la glucosa. Estos datos son consistentes con un trabajo previo (Velasco-García *et al.*, 2006), en el que se señala que la expresión de la BADH está sometida a represión catabólica cuando la glucosa está presente, aunque esto no ocurre cuando además del azúcar el medio incluye colina. Este fenómeno se debe a que cuando la colina está presente se une a BetI, proteína represora del operon *betIBA*, activando la expresión de los genes para metabolizar la colina. (Røkenes *et al.*, 1996; Wargo *et al.*, 2008). La presencia de 2.5 mM de H₂O₂ en el medio no provoca cambios importantes en la actividad de la BADH en la cepa silvestre, con respecto a las células control creciendo en los medios con colina, sin embargo la concentración máxima utilizada de H₂O₂ (75 mM) parece reprimir parcialmente la actividad en MCGLu, y totalmente en MCGLice (Fig. 10C y B, respectivamente). Esta represión total de la BADH causada por 75 mM del compuesto también se observó en la mutante *zwf* sometida al estrés en MCGLu (Fig. 11B). Los resultados sugieren, como ya se había mencionado, que al menos en concentraciones de H₂O₂ tan altas como 75 mM, esta enzima no participa en el proceso de tolerancia al estrés oxidativo. Llama la atención, sin embargo, que sea en el medio MCGLu en el que la cepa silvestre presenta una mayor tolerancia hacia el estrés (Figs. 4C y 5) y el único en el que, a pesar de existir 75 mM de H₂O₂ (Fig. 10C), se expresan simultáneamente la G6PDH, la BADH y la enzima IDH-NADP⁺, de la que se hablará más adelante. Esta información sugiere, que se requiere de la participación de estas tres enzimas en conjunto, para una mejor tolerancia hacia el estrés oxidativo.

Se ha propuesto que la BADH es importante en la tolerancia hacia un estrés osmótico en las condiciones que suelen presentarse durante el proceso de infección (Velasco-García *et al.*, 2006). El metabolismo del principal componente del surfactante pulmonar, el fosfolípido

FC, y una de las principales fuentes de carbono utilizadas *in vivo* por parte de *P. aeruginosa* (Son *et al.*, 2007), involucra la participación de esta enzima. La BADH participa de manera directa en la síntesis del osmoprotector GB, que ayuda a la bacteria a resistir el estrés osmótico mencionado (D'Souza-Ault *et al.*, 1992, Landfald y Strøm, 1986) como el que existe en las vías respiratorias de los pacientes con FQ (Terry *et al.*, 1991). El uso de la FC como fuente de carbono podría ser el resultado de un proceso evolutivo, consecuencia de las infecciones crónicas y el microambiente al que se ha visto expuesta la bacteria por años (Son *et al.*, 2007).

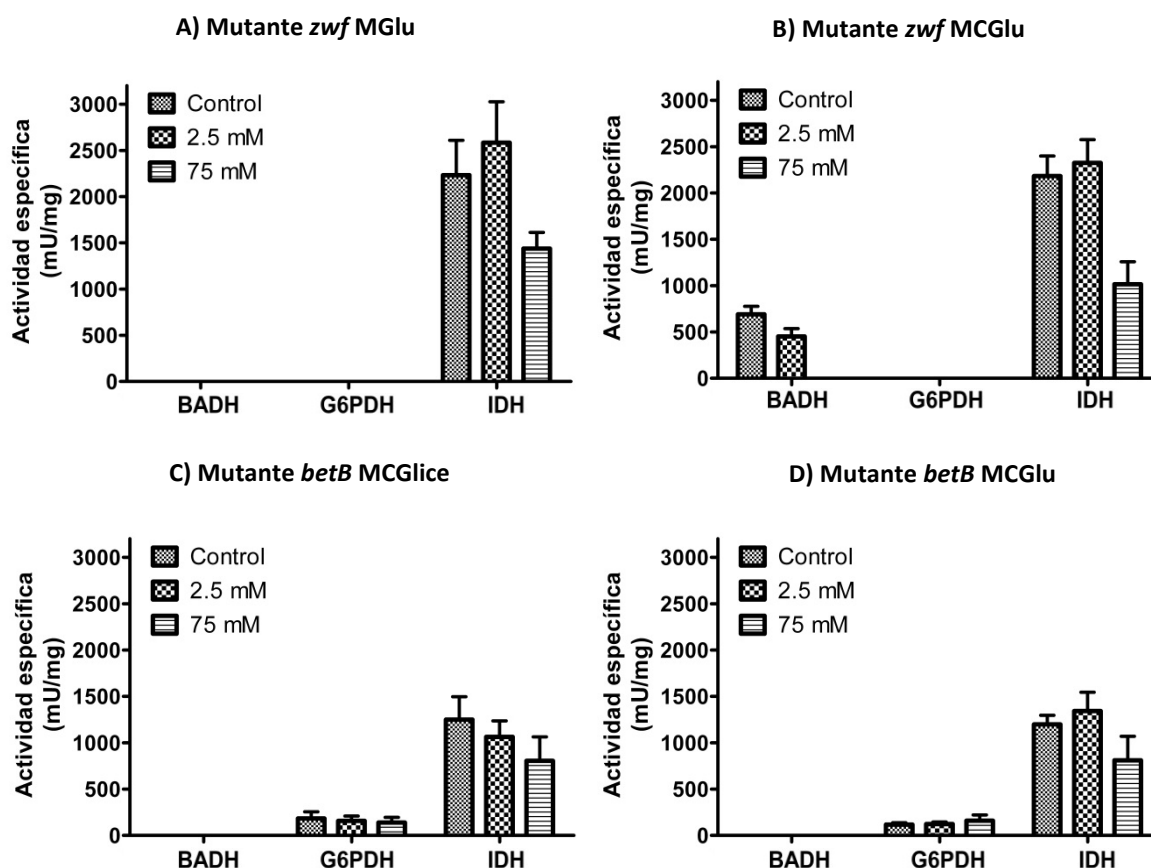


Figura 11. Actividad específica de las enzimas productoras de NADPH en las cepas mutantes *zwf* y *betB* de *P. aeruginosa* sometida a estrés oxidativo (H₂O₂), en los medios de cultivo indicados. Los datos mostrados son el resultado de tres repeticiones. Las barras de error indican la desviación estándar.

Como se ha venido mencionando, existe la idea generalizada de que la G6PDH es la principal productora de NADPH en varios organismos, incluyendo a *P. aeruginosa* (Greenberg *et al.*, 1990; Ma *et al.*, 1998; Lundberg *et al.*, 1999; Giró *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente se ha propuesto que otra enzima importante en la síntesis de esta coenzima sería la IDH-NADP⁺ (Jo *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Middaugh *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005; Bériault *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2007) y que por lo tanto, también podría jugar un papel en la defensa contra el estrés oxidativo. Interesantemente, en comparación con la BADH y la G6PDH, en este estudio la IDH-NADP⁺ fue la enzima que presentó mayor actividad en todas las cepas creciendo en los diferentes medios de cultivo utilizados (Figs. 10 y 11). Estos resultados de una alta actividad de IDH-NADP⁺ en todas las cepas estudiadas, sugiere que es una enzima que también podría participar en la tolerancia al estrés oxidativo como se ha mencionado previamente para *P. fluorescens* (Middaugh *et al.*, 2005; Bériault *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2007) y algunas células eucariotas (Jo *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002).

En contraste a lo encontrado en la cepa silvestre, la aplicación de 75 mM de H₂O₂ en todos los medios utilizados con ambas mutantes redujo sensiblemente la actividad de IDH-NADP⁺ (Fig. 11). Un punto que se destaca aquí es la alta actividad que presenta esta enzima en la mutante *zwf*, en ausencia del estrés oxidativo, y su aumento en presencia de una baja concentración de H₂O₂ (2.5 mM) (Fig. 11A y B), en este último caso, sugiere cierta participación de esta enzima en el estrés oxidativo. Zhao y colaboradores (2004) realizaron un experimento en *E. coli* en ausencia de estrés oxidativo, utilizando mutantes carentes del gen *zwf* y creciendo las bacterias en un medio mínimo con glucosa como única fuente de carbono. Estos investigadores encontraron un incremento de 1.35 veces en la actividad específica de la IDH-NADP⁺ de la mutante con respecto a la cepa silvestre, por lo que sugieren que el flujo de

carbono es dirigido hacia el ciclo de Krebs, en el que la IDH-NADP⁺ es la principal productora de NADPH. Un fenómeno similar al que ellos proponen explicaría la alta actividad de la IDH-NADP⁺ en la mutante *zwf* (Fig. 11A y B).

Se ha estudiado la sensibilidad de las enzimas del ciclo de Krebs al estrés provocado por el elemento aluminio en *P. fluorescens* (Middaugh *et al.*, 2005) o H₂O₂ en terminales nerviosas aisladas (Tretter y Adam-Vizi, 2000) y en mitocondrias aisladas de células cardíacas de rata (Nulton-Persson y Szweda, 2001), y se ha demostrado que la aconitasa, la α -cetoglutarato deshidrogenasa y la succinato deshidrogenasa son las enzimas más sensibles. Sin embargo, existe un reporte en el cual se demostró que la IDH mitocondrial dependiente de NADP⁺ de corazón de cerdo, cuando es incubada *in vitro* por dos horas con 10 mM de H₂O₂ disminuye 70% su actividad (Lee *et al.*, 2001). Estos reportes resaltan el daño oxidativo que podrían provocar las ROS si se acumulan en exceso dentro de la célula, ya que afectarían una vía metabólica muy importante.

5.4 Línea primaria de defensa contra el estrés oxidativo: las enzimas antioxidantes

Las ROS pueden dañar el ADN, los lípidos y las proteínas (Storz *et al.*, 1990; Cabiscol *et al.*, 2000; Lushchak, 2001; Halliwell, 2006) como mecanismo de defensa, las células eucariotas y procariotas poseen un sistema antioxidante capaz de eliminar las ROS (Halliwell y Gutteridge, 2007). En varias especies de bacterias, la respuesta al estrés oxidativo está regulada directamente por dos proteínas: OxyR y SoxS. Cuando la célula está expuesta a altos niveles de óxido nítrico o O₂^{•-}, se induce la transcripción del gen *soxR*, que posteriormente activa la transcripción del gen *soxS* (Storsz *et al.*, 1990; Lushchak, 2001). El regulón *soxRS* incluye una gran cantidad de genes en *E. coli*, entre los que se encuentran *sodA* (Mn-SOD), *fumC* (Fumarasa redox resistente), *ahpC* (Subunidad pequeña de la Ahp) y *zwf* (G6PDH),

entre otros (Pomposiello *et al.*, 2001a). Sin embargo, en *P. aeruginosa* se ha identificado un homólogo de SoxR pero aparentemente no tiene homólogo de SoxS. Además, SoxR es activado por el $O_2^{\cdot-}$ como en otras especies, pero parece que su función fisiológica es para resistencia a antibióticos, pues se ha demostrado en un modelo de infección pulmonar en ratón, que es requerido para la virulencia (Palma *et al.*, 2004). Así, el paradigma de SoxRS descrito para otras especies de bacterias, no se cumple en *P. aeruginosa*, por lo que su función en la respuesta al estrés oxidativo aún no está clara (Palma *et al.*, 2004).

En respuesta a elevadas concentraciones de H_2O_2 , se forma un puente disulfuro entre los residuos Cys¹⁹⁹ y Cys²⁰⁸ de la proteína OxyR, provocando un cambio conformacional que activa a OxyR como factor de transcripción (Zheng *et al.*, 1998), que regula la expresión de numerosos genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, tales como *oxyS*, *ahpCF*, *katG*, *dps*, *gorA* y *grxA* en *E. coli* (Pomposiello y Demple, 2001b), así como *katB-ankB*, *ahpB*, *ahpC-ahpF* en *P. aeruginosa* (Ochsner *et al.*, 2000). El gen *grxA* codifica para la enzima glutaredoxina, que a su vez cataliza la reducción del puente disulfuro de OxyR a expensas del GSH (Zheng *et al.*, 1998), por lo que OxyR posee mecanismos de autorregulación durante el estrés oxidativo (Pomposiello y Demple, 2001b).

Muchos organismos poseen diversas enzimas encargadas de combatir el estrés oxidativo provocado por el H_2O_2 , entre las que destaca la catalasa. *P. aeruginosa* posee al menos tres tipos de catalasas (Stover *et al.*, 2000), KatA, una enzima constitutiva (Stewart *et al.*, 2000), KatB, que es inducida por H_2O_2 (Brown *et al.*, 1995) y KatC, de la cual no se conoce bien su función (Elkins *et al.*, 1999). Estas enzimas son importantes para la supervivencia a la toxicidad causada por altas concentraciones de H_2O_2 , pues se ha demostrado que mutantes del gen *katA* expuestas a una alta dosis de H_2O_2 (50 y 75 mM) muestran una severa disminución en la viabilidad con respecto a la cepa silvestre (Hassett *et al.*, 1999),

mientras que aquellas que carecen del gen *katB* solo son ligeramente más sensibles (Elkins *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha postulado que KatB es la principal enzima en la línea de defensa contra el estrés oxidativo exógeno, como el que se presenta en pacientes con FQ (Brown *et al.*, 1995). Otra enzima importante en la detoxificación de H₂O₂ es la Ahp dependiente de NAD(P)H que cataliza la conversión de peróxidos orgánicos a sus respectivos alcoholes (Jacobson *et al.*, 1989), pero que también puede utilizar H₂O₂, en concentraciones bajas (Niimura *et al.*, 1995; Seaver e Imlay, 2001). En estudios del transcriptoma de *P. aeruginosa* bajo estrés oxidativo, se ha encontrado un incremento en los niveles de los ARNm transcritos desde los genes *ahpA*, *ahpB*, *ahpCF* y *ohr* (Palma *et al.*, 2004; Salunke *et al.*, 2005), que codifican para las cuatro Ahp que posee la bacteria (Ochsner *et al.*, 2000). Además, un estudio reciente indica que las mutantes carentes del gen *ahpCF* presentan alta sensibilidad al H₂O₂ en biofilms (Panmanee y Hassett, 2009).

Los resultados presentados en las gráficas de crecimiento de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* creciendo bajo diferentes concentraciones de H₂O₂ (Fig. 4) reflejan indirectamente la participación de estas enzimas (las catalasas y las Ahp), pues su actividad catalítica ayuda a la bacteria a detoxificar el H₂O₂ y de esta forma, la bacteria puede recuperarse del estrés al que estuvo expuesta. Sin embargo, en el caso de las mutantes *zwf* y *betB* (Fig. 7), la ausencia de las enzimas afecta la producción de NADPH y por lo tanto al crecimiento, esta alteración en los niveles de la coenzima reductora podría llevar a un incremento en el GSSG, por falta de reducción del mismo (Halliwell y Gutteridge, 2007) o a una inactivación de la catalasa por el H₂O₂ (compuesto II) (Kirkman y Gaetani, 1984; Hillar *et al.*, 1994). Sin embargo, hacen falta estudios adicionales para probar la relación entre las enzimas detoxificantes y las productoras de NADPH. Otra posibilidad a considerar es que, a pesar de que se demostró que en los medios de cultivo utilizados, en ausencia de bacterias, no se encontró un cambio considerable

en la concentración de H₂O₂ (Fig. 6), desconocemos si la presencia de diferentes fuentes de carbono podría llevar a una mayor expresión de las enzimas detoxificantes y, de esta forma ayudar en la tolerancia al estrés oxidativo, como se observa en MCGlu (Fig. 4C), que fue el medio en el que mayor tolerancia se presentó en la cepa silvestre.

Durante la realización de este trabajo hubo ocasiones en las que el estrés con H₂O₂ se indujo, por error, tardíamente, cuando algunos de los cultivos se encontraban en una etapa posterior del crecimiento (Abs_{600nm}: 0.6 – 0.7 unidades de absorbancia). Los resultados obtenidos en esos experimentos (no presentados) mostraron que las bacterias presentaban mayor tolerancia que aquellas en las que el estrés se indujo cuando tenían 0.5 unidades de absorbancia; esto puede ser explicado en parte por el fenómeno dependiente de la densidad celular conocido como *quorum sensing*, que se sabe controla la expresión génica de diversos procesos involucrados en la bioluminiscencia, la virulencia, la formación de biofilms, la nodulación, la motilidad (Fuqua *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2007) e incluso en el estrés oxidativo. Se ha demostrado que en *P. aeruginosa* el *quorum sensing* modula diversos genes, entre los que se encuentran *katA*, *sodA* y *sodB* (Hassett *et al.*, 1999). Estas observaciones indican que una tolerancia óptima al estrés oxidativo no puede ser solamente atribuida al efecto combinado de las catalasas y las Ahp, sino que existe todo un circuito regulatorio de mayor complejidad implicado en este proceso.

5.5 Cuantificación de las coenzimas NADPH y NADP⁺

Determinar los niveles de NADPH/NADP⁺ es de gran interés, especialmente cuando en esta investigación se está poniendo a prueba la hipótesis de si el NADPH es un factor importante para la tolerancia de *P. aeruginosa* al estrés oxidativo. En este trabajo se cuantificaron los niveles de estas coenzimas mediante dos métodos: ciclamiento enzimático y

HPLC. En ambos casos se utilizaron extracciones con HCl o NaOH, pues la literatura menciona que a un pH 2, el NADH y el NADPH son destruidos en un 99.9%. Mientras que a un pH 12, se destruye el 99.9% del NAD^+ y el NADP^+ (Lowry, 1980).

El ciclamiento enzimático es un método que permite detectar ciertas moléculas, como por ejemplo el ATP, el NADH y el NADPH, entre otras, en niveles tan bajos como 10^{-15} – 10^{-17} moles. Para ello, el sistema amplifica las concentraciones basales de estos compuestos utilizando, en el caso específico de la determinación de las coenzimas mencionadas, un sistema oxido-reductor que involucra una o dos enzimas y ciertos indicadores redox (Lowry, 1980), como se ilustra en la Fig. 12. Posteriormente, la cuantificación del amplificado de interés se realiza midiendo espectrofotométrica o fluorimétricamente la formación del producto de la reacción.

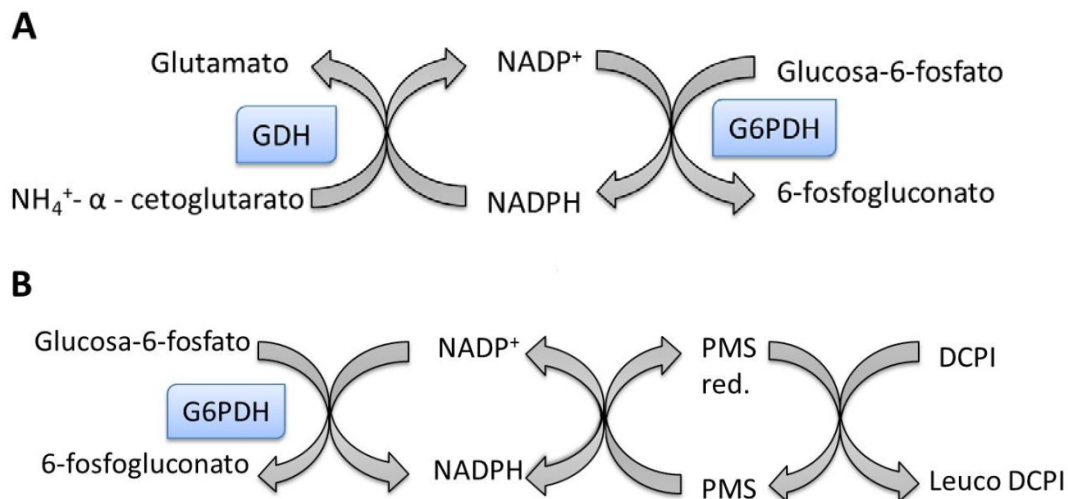


Figura 12. Dos sistemas de ciclamiento enzimático utilizados para amplificar los niveles de NADP^+ y NADPH . A) En este ejemplo, el ciclamiento se realiza mediante el uso de dos enzimas, GDH y G6PDH, que permiten la oxidación y reducción alternada del NADPH . B) Se utiliza una sola enzima, G6PDH, que permite la formación del NADPH que dona electrones a los indicadores redox (PMS y DCPI). GDH: glutamato deshidrogenasa; G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; PMS: fenazina metasulfato; PMS red.: fenazina metasulfato reducida; DCPI: diclorofenolindofenol.

En este trabajo, el ciclamiento enzimático se llevó a cabo mediante el uso del kit EnzyChrom NADP⁺/NADPH Assay Kit, de Bioassay Systems, que utiliza, como en el ejemplo de la Fig. 12B, a la enzima G6PDH y al PMS, pero que sustituye al DCPI con el azul de tiazolil o metil tiazolil tetrazolio (MTT), para tener como producto final reducido al azul de formazán (Nisselbaum y Green, 1969). En este ensayo la velocidad de reducción del MTT es proporcional a la concentración de la coenzima, y la formación del azul del formazán puede seguirse a una longitud de onda de 565 nm.

Primero se hizo una curva estándar con las concentraciones de NADP⁺ que se muestran en la Fig. 13, que sería usada para la cuantificación de nucleótidos de piridina en las muestras. Las instrucciones del Kit indican que se debe medir la absorbancia (565 nm) a los 0 y 30 minutos y, la linealidad debería mantenerse constante a lo largo de este tiempo. Así, se procedió a realizar las respectivas mediciones de las muestras obtenidas de células de la cepa silvestre, utilizando en una de las muestras, un control interno de NADP⁺ (5 μM); esto último se hizo con el fin de comprobar si se recuperaba la cantidad de coenzima agregada. Los resultados de la Tabla 7, muestran que tanto en la muestra de NADP⁺ como en la de NADPH, se detectaron bajos niveles de estas coenzimas. Además, en la muestra a la que se le agregó el control interno, tampoco se recuperó el NADP⁺ añadido al inicio de la extracción. Debido a este inconveniente, en lugar de hacer únicamente dos lecturas (0 y 30 min) para cada una de las concentraciones de NADP⁺ de la curva patrón, para las dos muestras y para el control interno mencionado, se decidió medir la velocidad inicial de la reacción de la enzima G6PDH en cada una de ellas. Los resultados obtenidos para cada concentración de NADP⁺ de la curva patrón, fue una línea recta a lo largo de los 30 min que se siguió la reacción (datos no mostrados), lo que se muestra en las indicaciones del kit EnzyChrom son correctas; no obstante, cuando se intentó obtener la velocidad inicial de la G6PDH del kit en las muestras

resultó infructuoso, ya que desde los primeros segundos las tres curvas de progreso presentaron una inflexión pronunciada (datos no mostrados). Estos resultados sugieren la presencia de un inhibidor de la G6PDH en los extractos de *P. aeruginosa*, debido a que la extracción de las coenzimas no es tan específica.

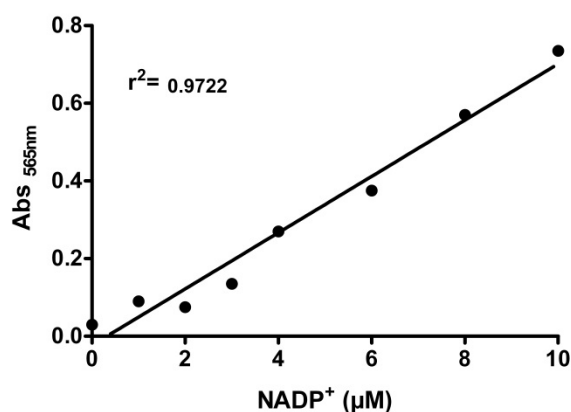


Figura 13. Curva patrón de NADP⁺ para la cuantificación de nucleótidos de piridina.

Tabla 7. Cuantificación de coenzimas extraídas con ácido para la forma oxidada o base para la forma reducida. Nótese que en la muestra enriquecida, no se recuperan la cantidad de NADP⁺ agregado.

Tipo de extracción	Concentración calculada de NADP ⁺ o NADPH (µM)
HCl (NADP ⁺)	1.64
HCl (NADP ⁺) + 5µM de NADP ⁺	2.33
NaOH (NADPH)	0.96

Como los ensayos con ciclamiento enzimático no permitieron la cuantificación de las coenzimas, se decidió utilizar la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), otro de los métodos utilizados para la cuantificación de NADP⁺ y NADPH y que posee un intervalo de sensibilidad de 10⁻⁵ a 10⁻¹¹ g/mL (Brinkman, 1987). Como primer paso, se inyectaron, por separado, los estándares de NADP⁺, NADPH, NAD⁺ y NADH, a una

concentración de 100 μ M cada uno, para obtener sus tiempos de retención (cromatograma punteado en las Figs. 14-17). La ausencia de picos en el cromatograma de la muestra (Fig. 14A), correspondientes a las coenzimas NADP⁺ y NAD⁺, podría ser resultado de: a) que los niveles de estas moléculas sean tan bajos que no pueden ser detectadas a través de este método, o b) que el método utilizado para su extracción no sea el adecuado para obtenerlas desde las células. Con la finalidad de conocer si las concentraciones micromolares de estas moléculas podrían detectarse a través de este método en la misma muestra antes utilizada, se decidió enriquecerla agregándole, por separado y justo antes de inyectarla en el aparato de HPLC, las coenzimas NADP⁺ 100 μ m, NADPH 100 μ M, NAD⁺ 50 μ M y NADH 50 μ M. Como se observa en la Fig. 14B, sí es factible detectar en el extracto de la cepa silvestre los picos de absorción correspondientes a cada una de las coenzimas agregadas, aunque los tiempos de retención están ligeramente desplazados a la izquierda.

Los resultados anteriores sugieren que la detección de las coenzimas mediante el uso del HPLC es apropiado, sin embargo, no se podría descartar el que durante la extracción se pierdan las coenzimas intracelulares, posiblemente por compuestos o enzimas que pueden quelarlas o degradarlas, respectivamente. Para probar esto, antes de iniciar la extracción ácida desde células de la cepa silvestre, se les añadió, por separado NADP⁺ y NAD⁺, a una concentración de 200 y 100 μ M, respectivamente.

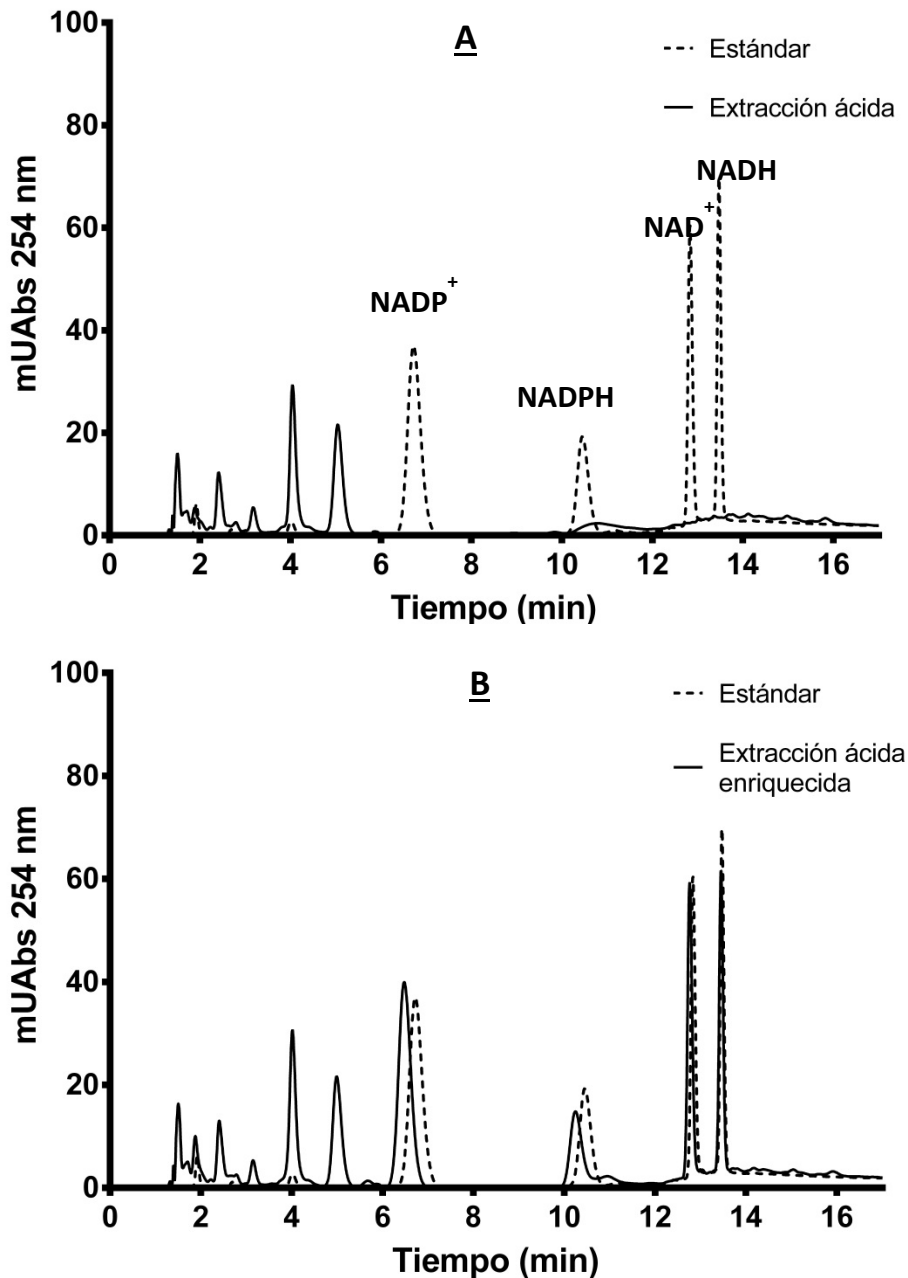


Figura 14. Cromatograma de la extracción ácida de la cepa silvestre y (A) la extracción ácida enriquecida con NADP⁺ 100µm, NADPH 100 µM, NAD⁺ 50 µM y NADH 50 µM (B). Nótese que en B, los tiempos de retención son similares a los de los estándares de las coenzimas oxidadas y reducidas.

Los resultados obtenidos, después de esta extracción ácida y de intentar separar las coenzimas a través de HPLC, se muestran en la Fig. 15, que en ninguno de los casos hay picos de absorción a los 6.7 min para el NADP⁺ (Fig. 15A) ó 12.8 min para el NAD⁺ (Fig. 15B),

como ya se había determinado en los estándares de las coenzimas. Esta información indica que, aparentemente en la extracción ácida no se extraen las coenzimas NADP^+ y NAD^+ , aunque desconocemos la causa.

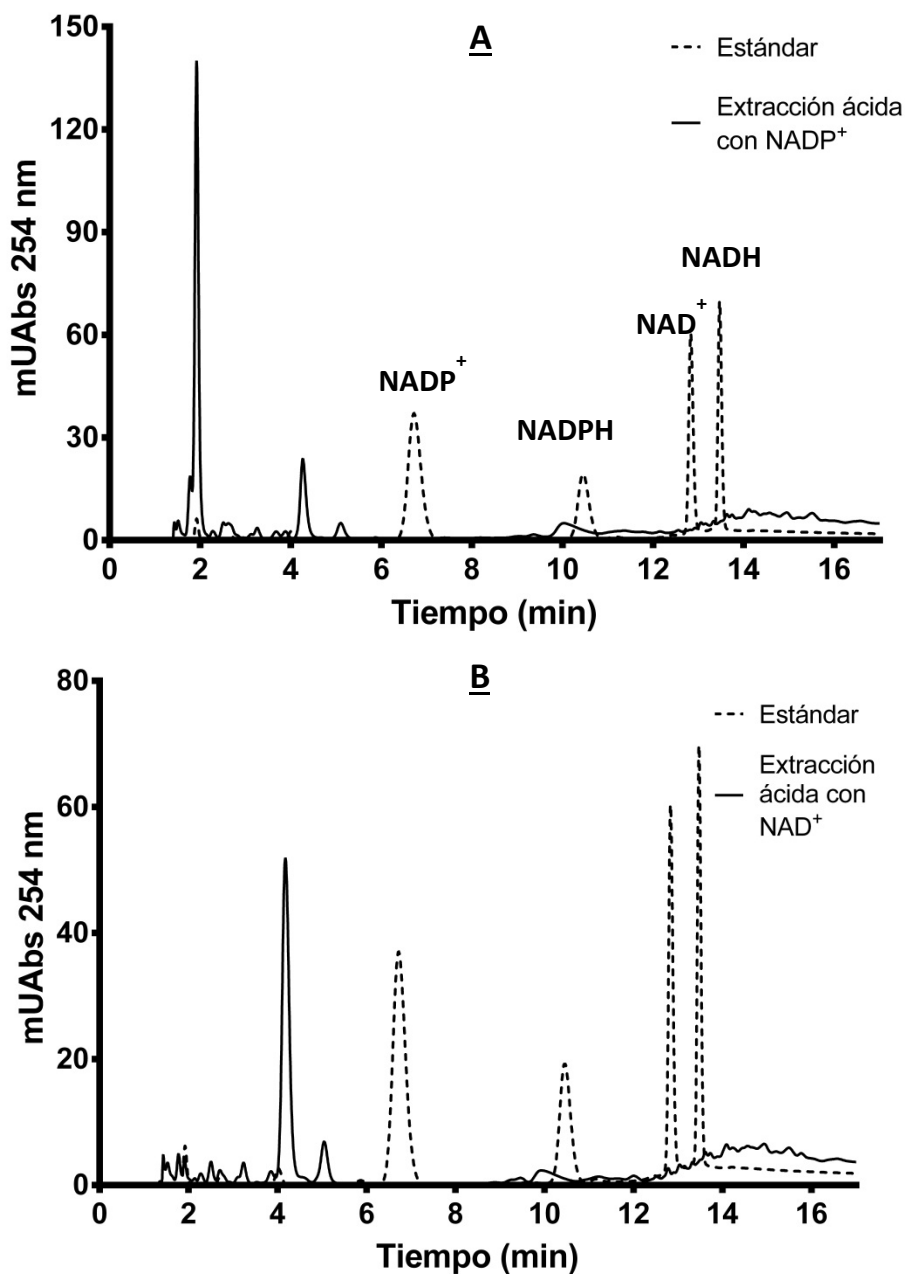


Figura 15. Cromatograma de la extracción ácida con un control interno de NADP^+ 200 μM (A) o NAD^+ 100 μM (B).

Como ya se había mencionado, durante la extracción básica se destruye el 99.9% de las formas oxidadas de las coenzimas, quedando las formas reducidas. En la Fig.16 se muestra un cromatograma de la extracción con NaOH de la cepa silvestre, sin embargo no se observaron los picos de absorción para el NADPH ni para el NADH. Entonces, se verificó el método de la misma manera que se hizo con la extracción ácida, enriqueciendo una muestra con NADPH 200 μ M o NADH 100 μ M. Se encontró que en ambas muestras, se recuperaban los niveles de coenzima agregada, ya fuera NADPH o NADH (Fig. 17). Por lo que, de acuerdo a los resultados obtenidos en las Figs. 15 y 17, se puede concluir que el método de extracción empleado es adecuado para la extracción de las coenzimas reducidas (NADPH y NADH), pero no para las oxidadas (NADP⁺ y NAD⁺).

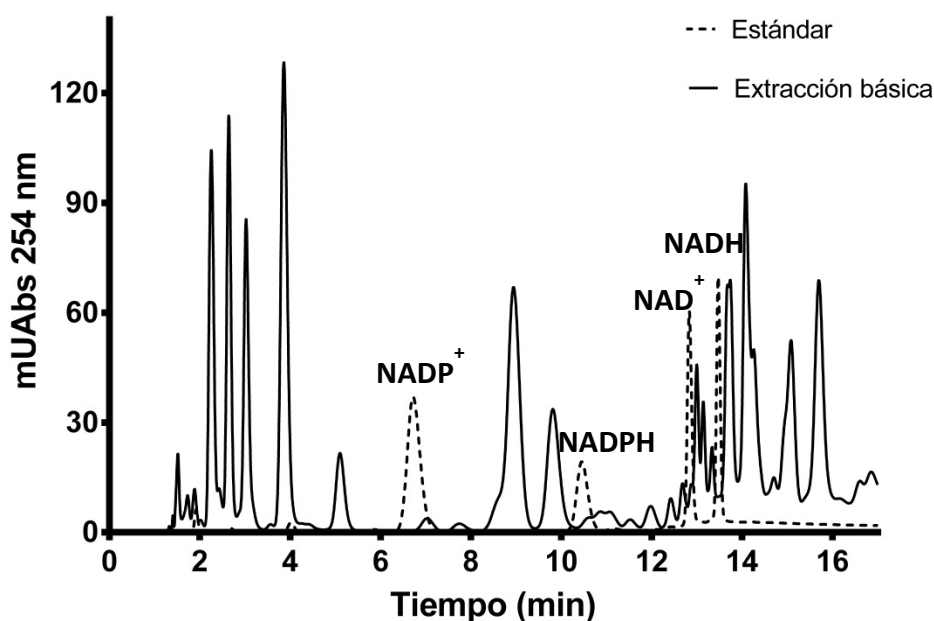


Figura 16. Cromatograma de la extracción básica de la cepa silvestre. Los picos de absorción de la muestra no coinciden con los del NADPH o el NADH.

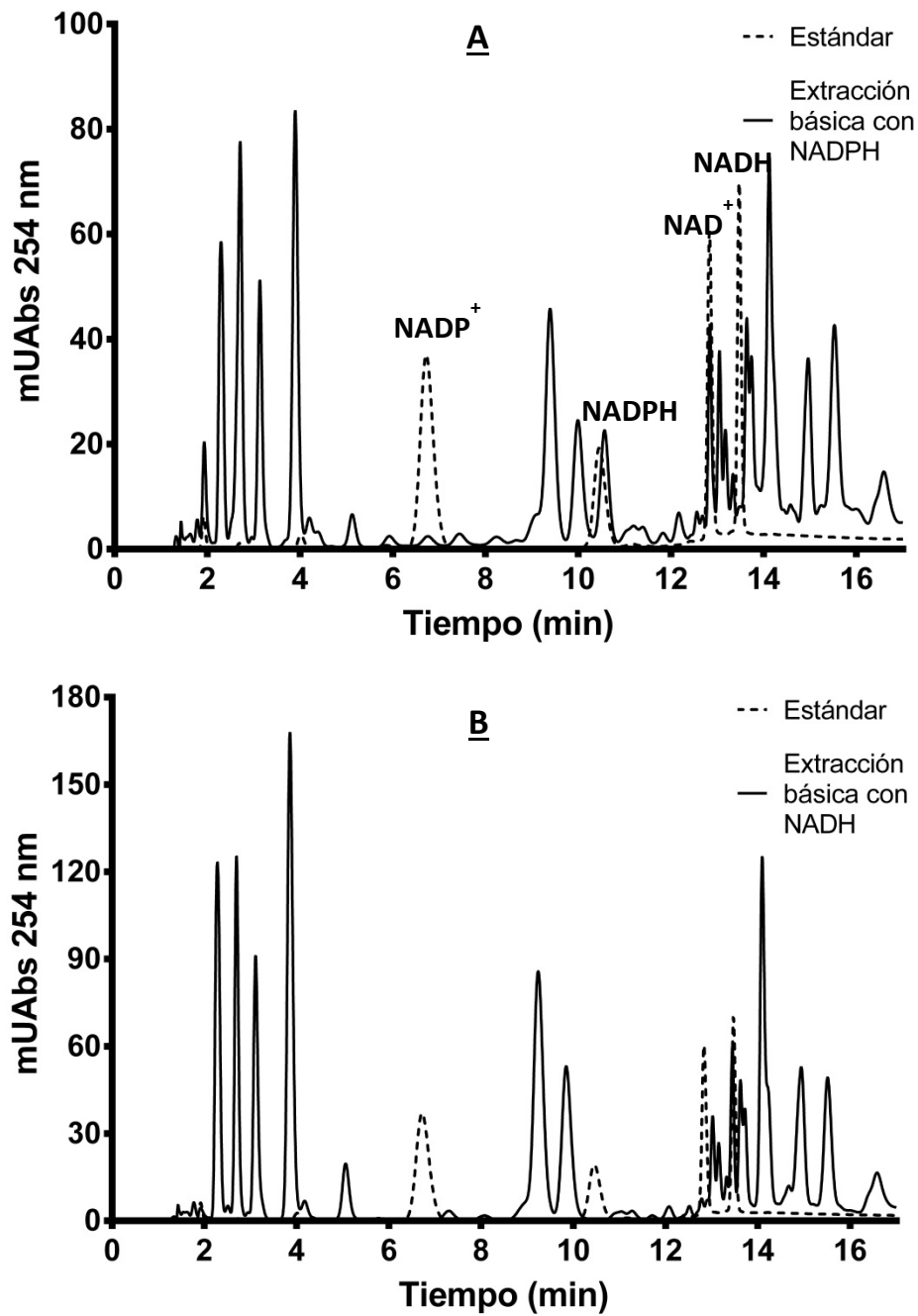


Figura 17. Cromatograma de la extracción básica de la cepa silvestre, enriquecida con un control interno de NADPH 200 μ M (A) y, enriquecida con NADH 100 μ M (B).

6.- Conclusiones

El objetivo principal de este trabajo fue determinar la participación de las enzimas BADH y G6PDH en la tolerancia de *P. aeruginosa* hacia el estrés oxidativo provocado por H₂O₂. La hipótesis propuesta consideraba, 1) los múltiples antecedentes que mencionan a G6PDH como la principal productora del NADPH que utiliza el sistema enzimático de la bacteria encargado de combatir directamente el estrés oxidativo; 2) las similitudes entre la BADH y la G6PDH, en cuanto a características cinéticas, su alta eficiencia catalítica y su elevada capacidad productora de NADPH; y 3) la participación diferencial de estas enzimas en el metabolismo de *P. aeruginosa*, dependiente de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo.

Los resultados de los experimentos en los que se aplicó el estrés oxidativo a la cepa silvestre creciendo en medios de cultivo que ayudan a discriminar la participación de las enzimas mencionadas, y en los que también se utilizaron mutantes carentes de éstas, nos permiten señalar lo siguiente:

- La BADH es una enzima que difícilmente podría participar como la principal proveedora del poder reductor que se requiere para la tolerancia, pues de las estudiadas, ésta fue la única que disminuyó considerablemente en su actividad durante un estrés severo (75 mM de H₂O₂).
- De manera distinta, la actividad de G6PDH no se afectó por el estrés aplicado, pero tampoco presentó un incremento como el que se reporta en la literatura para diferentes bacterias, incluyendo a *P. aeruginosa*.

- La participación conjunta de G6PDH y BADH pareciera necesaria para brindar a la bacteria una mayor tolerancia hacia el estrés oxidativo, como se observó al crecer la cepa silvestre en un medio con colina y glucosa (MCGlu).
- La IDH-NADP⁺ es otra enzima productora de NADPH, constitutiva, que posiblemente también contribuya en la tolerancia de *P. aeruginosa* hacia el estrés oxidativo. Esto, basado en lo siguiente: 1) que la bacteria despliega, en todos los medios de crecimiento, una actividad específica de IDH-NADP⁺ superior a la que mostraron juntas la BADH y la G6PDH; 2) que la actividad de esta enzima en la cepa silvestre no se modifica con el estrés aplicado, y 3), que la mutante carente de G6PDH exhibe una alta actividad de IDH-NADP⁺; posiblemente como un mecanismo en el que se intenta suplir la ausencia de la primera.
- Además del metabolismo de la glucosa y de la colina, el del glicerol también parecería contribuir en la tolerancia mencionada. Los experimentos en donde la mutante carente de BADH se creció en colina y glicerol (MCGlice), y en el que fue tan tolerante al estrés como la cepa silvestre, apoyan esta idea.

Considerando todos estos puntos, podemos concluir que la tolerancia de *P. aeruginosa* hacia el estrés oxidativo parecería ser una respuesta multifactorial, en la que no únicamente estarían involucradas enzimas que combaten directamente a las ROS, como la SOD, la catalasa y la GPrx, sino también aquellas altamente productoras de NADPH, como las aquí estudiadas, y cuya participación, y por ende de la vía metabólica en la que actúan, dependería de la fuente de carbono presente en el medio que crece la bacteria. Esta división de la

actividad de síntesis del poder reductor entre enzimas de diferentes vías metabólicas parece relacionarse con la amplia plasticidad metabólica que caracteriza a *P. aeruginosa*, y que le confiere una alta capacidad invasora y adaptativa para conquistar diversos ambientes, por lo que es considerada un patógeno cosmopolita, de difícil erradicación en el humano.

7.- Perspectivas

Con la finalidad de dar continuidad a esta investigación, se enlistan algunos aspectos que en el futuro tendrían que considerarse.

- Medir la concentración de H_2O_2 en el medio extracelular, en presencia de bacterias, para conocer cuál es la verdadera concentración a la que están expuestas las células a lo largo del experimento.
- Medir la actividad o expresión de las enzimas que inactivan directamente H_2O_2 , en los diferentes medios en que se crece la bacteria, para conocer si alguna de las fuentes de carbono lleva a una mayor participación de estas enzimas, durante el estrés oxidativo.
- Obtener mutantes desprovistas de las enzimas que inactivan el H_2O_2 por mecanismos que no requieren poder reductor (p. ej. catalasas), con la finalidad de conocer el grado de participación que tienen éstas y las que si utilizan dicho poder.
- Determinar en estas mutantes el grado de tolerancia hacia el estrés provocado con H_2O_2 , creciéndolas en presencia de diferentes fuentes de carbono.
- Investigar la participación que podrían tener las $NADP^+$ -deshidrogenasas del metabolismo del glicerol (p. ej. G3PDH o la GAPDH), en la tolerancia de la bacteria hacia el estrés oxidativo.
- Realizar experimentos con la mutante *betB*, con el objetivo de conocer si el osmoprotector GB evita la lisis celular observada en este trabajo.
- Investigar y estandarizar métodos alternos que nos permitan cuantificar las coenzimas $NADP^+$, NAD^+ , $NADPH$ y $NADH$, en *P. aeruginosa* sometida a los diferentes tratamientos utilizados en este trabajo.

8.- Referencias

- Banerjee, P.C., Vanags, R.I., Chakrabarty, A.M. y Maitra, P.K. 1983. Alginic acid synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* mutants defective in carbohydrate metabolism. **Journal of bacteriology**. 155: 283-245.
- Bériault, R., Hamel, R., Chenier, D., Mallioux, R.J., Joly, H., y Appanna, V.D. 2007. The overexpression of NADPH-producing enzymes counters the oxidative stress evoked by gallium, an iron mimetic. **Biometals**. 20: 165-176.
- Berrouane, Y.F., McNutt, L.A., Buschelman, B.J., Rhomberg, P.R., Sandford, M.D., Hollis, R.J., Pfaller, M.A. y Herwaldt, L.A. 2000. Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* infections caused by a contaminated drain in a whirlpool bathtub. **Clinical infectious diseases**. 31(6): 1331-1337.
- Blanco, H.O. 2004. Propiedades antiinflamatorias del surfactante pulmonar y su aplicación en la clínica. **Biotecnología aplicada**. 21: 70-76.
- Bowler, R.P. y Crapo, J.D. 2002. Oxidative stress in airways. Is there a role for extracellular superoxide dismutase? **American journal of respiratory and critical care medicine**. 166 (12 pt 2): S38-43.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**. 72: 248-254.
- Brinkman, U.A.T. 1987. A review of reaction detection in HPLC. **Chromatographia**. 24: 190-200.
- Brown, S.C., Howell, M.L., Vasil, M.L., Anderson, A.J. y Hassett, D.J. 1995. Cloning and characterization of the *katB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. **Journal of bacteriology**. 177(22): 6536-6544.
- Brown, S.M., Upadhyya, R., Shoemaker, J.D. y Lodge, J.K. 2010. Isocitrate dehydrogenase is important for nitrosative stress resistance in *Cryptococcus neoformans*, but oxidative stress resistance is not dependent on glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Eukaryotic cell**. 9(6): 971-980.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. y Ros, J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International microbiology**. 3:3-8.
- Cho, S., Law, J. y Kwang, C. 2009. Effect of growth at sub-lethal concentrations of kanamycin on the cell membrane integrity and amount of capsular glucuronic acid in wild-

type *Escherichia coli* and strain with *cpsB* mutation. **Journal of experimental microbiology and immunology**. 13: 29-35.

Cohen, T.S. y Prince, A. 2012. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. **Nature medicine**. 18(4): 509-519.

Coiofu, O., Riis, B., Pressler, T., Poulsen, H.E. y Høiby, N. 2005. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress cause by chronic lung inflammation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. 46(6): 2276-2282.

Costa, S.L. e Imlay, J.A. 2001. Alkyl hydroxiperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**. 183(24): 7173-7181.

D'Souza-Ault, M.R., Smith, L.T. y Smith, G.M. 1992. Roles of N-actylglutaminyglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. **Applied and environmental microbiology**. 59: 473-478.

Del Castillo, T., Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J.J., Fuhrer, T., Sauer, U. y Duque, E. 2007. Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. **Journal of bacteriology**. 189(14): 5142-5152.

Desneux, N., Decourtye, A. y Delpuech, J.-M. 2007. The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual review of entomology**. 52: 81-106.

Domenech, C.E., Otero, L.H. Beassoni, P.R. y Lisa, A.T. 2011. Phosphorylcholine phosphatase: a peculiar enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*. **Enzyme research**. 2011: 1-12.

Elkins, J.G., Hassett, D.J., Stewart, P.S., Schweizer, H.P. y McDermott, T.R. 1999. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. **Applied and environmental microbiology**. 65(10): 4594-4600.

Fuhrer, T., Fischer, E. y Sauer, U. 2005. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. **Journal of bacteriology**. 187(5): 1581-1590.

Fuqua, C., Parsek, M.R. y Greenberg, E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: Acyl-homoserine lactone quorum sensing. **Annual review of genetics**. 35: 439-468.

Gaetani, G.F, Ferraris, A.M, Sanna, P. y Kirkman, H.N. 2005. A novel NADPH:(bound) NADP⁺ reductase and NADH:(bound) NADP⁺ transhydrogenase function in bovine liver catalase. **Biochemical journal**. 385:763-768.

García, O.A.M. y Ponce, R.E. 2003. Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. **Biotecnología aplicada**. 20: 85-94.

Giró, M., Carrillo, N. y Krapp, A.R. 2006. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and ferredoxin-NADP(H) reductase contribute to damage repair during the *soxRS* response of *Escherichia coli*. **Microbiology**. 152: 1119-1128.

Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.-M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B. y Labarre, J. 1998. The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. **The journal of biological chemistry**. 273(34): 22480-22489.

González-Parrága, P., Hernández, J.A. y Argüelles, J.C. 2003. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress (H₂O₂) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. **Yeast**. 20: 1161-1169.

Greenberg, J.T., Monach, P., Chou, J.H., Josephy, P.D. y Demple, B. 1990. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 87: 6181-6185.

Halliwell, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**. 141: 312-322.

Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine. Editorial Oxford University Press, Nueva York. Cuarta edición. 1-187 p.

Hampel, K.J., LaBauve, A.E., Meadows, J.A., Fitzsimmons, L.F., Nock, A.M. y Wargo, M.J. 2014. Characterization of the GbdR regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**. 196: 7-15.

Hassett, D.J., Ma, J.-F., Elkins, J.G., McDermott, T.R., Ochshner, U.A., West, S.E.H., Huang, C.-T., Fredericks, J., Burnett, S., Stewart, P.S., McFeters, G., Passador, L. e Iglewski, B.H. 1999. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. **Molecular microbiology**. 34(5): 1082-1093.

Heath, H.E. y Gaudy, E.T. 1978. Relationship between catabolism of glycerol and metabolism of hexosephosphate derivatives of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**. 136(2): 628-646.

Hillar, A., Nicholls, P., Switala, J. y Loewen, P.C. 1994. NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast, and *Escherichia coli* enzymes. **Biochemical journal**. 300: 531-539.

Izawa, S., Maeda, K., Miki, T., Mano, J., Inoue, Y. y Kimura, A. 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the adaptative response to hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical journal**. 330: 811-817.

Jacobs, M.A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C., Levy, R., Chun-Rong, L., Guenther, D., Bovee, D., Olson, M. y Manoil, C. 2003. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 100(24): 14339-14344.

Jacobson, F.S., Morgan, R.W., Christman, M.F y Ames, B.N. 1989. An alkyl hydroperoxide reductasa from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage: purification and properties. **The journal of biological chemistry**. 264(3): 1488-146.

Jo, S.-H., Son, M.-K., Koh, H.-J., Lee, S.-M., Song, I.-H., Kim, Y.-O., Lee, Y.-S., Jeong, K.-S., Kim, W.B., Park, J.-W., Song, B.J. y Huhe, T.-L. 2001. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺- dependent isocitrate dehydrogenase. **The journal of biological chemistry**. 276(19): 16168-16176.

Jouve, H.M., Pelmont, J. y Gaillard, J. 1986. Interaction between pyridine adenine dinucleotides and bovine liver catalase: a chromatographic and spectral study. **Archives of biochemistry and biophysics**. 248: 71-79.

Juhnke, H., Krems, B., Kötter, P. y Entian, K.-D. 1996. Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role or the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. **Molecular & general genetics**. 252: 456-464.

King, R.J. 1982. Pulmonary surfactant. **Journal of applied physiology**. 53: 1-8.

Kirkman, H.N. y Gaetani, G.F. 1984. Catalase: A tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 81: 4343-4347.

Kirkman, H.N., Galiano, S. y Gaetani, G.F. 1987. The function of catalase-bound NADPH. **The journal of biological chemistry**. 262(2): 660-666.

Kirkman, H.N, Rolfo, M., Ferraris A.M. y Gaetani, G.F. 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. **The journal of biological chemistry**. 274(20): 13908-13914.

Kirkman, H.N. y Gaetani, G.F. 2007. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **TRENDS in biochemical sciences**. 32: 44-50.

Krems, B., Charizanis, C. y Entian, K.-D. 1995. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* sensitive to oxidative and osmotic stress. **Current genetics**. 27: 427-434.

- Landfald, B. y Strøm, A.R. 1986. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**. 165(3): 849-855.
- Lebeque, P.Y., Morris, Q.H.J. y Calás, V.N. 2006. Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista cubana de medicina**. 45: 0-0.
- Lee, S.M., Huh, T.-L. y Park, J.W. 2001. Inactivation of NADP⁺ -dependent isocitrate dehydrogenase by reactive oxygen species. **Biochimie**. 83(11-12): 1507-1065
- Lee, S.M., Koh, H.-J., Park, D.-C., Song, B.Y., Huh, T.-L. y Park, J.-W. 2002. Cytosolic NADP⁺ - dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. **Free radical biology & medicine**. 32(11): 1185-1196.
- Lee, I.Y., M.K. Kim, Y.H. Park, S.Y. Lee. 1996. Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology and bioengineering**. 52: 707-712.
- Lessie, T. y Neidhardt, F.C. 1967. Adenosine triphosphate-linked control of *Pseudomonas aeruginosa* glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Journal of bacteriology**. 93(4): 1337-1345.
- Li, Y. y Schellhorn, H.E. 2007. Rapid kinetic microassay for catalase activity. **Journal of biomolecular techniques**. 18(4): 185-187.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Vero, S., Tian, S. y Hershkovitz, V. 2011. Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatum*. **International journal of food microbiology**. 146: 76-83.
- Lowry, O.H. 1980. Amplification by enzymatic cycling. **Molecular & cellular biochemistry**. 32: 135-146.
- Lundberg, B.E., Wolf Jr., R.E., Dinauer, M.C., Xu, Y. y Fang, F.C. 1999. Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for *Salmonella typhimurium* virulence and resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates. **Infection and immunity**. 67: 436-438.
- Lushchak, V.I. 2001. Oxidative stress and mechanisms of protection against it in bacteria. **Biochemistry (Moscov)**. 66(5): 476-489.
- Ma, J.-F., Hager, P.W., Howell, M.L., Phibbs, P.V. y Hassett, D.J. 1998. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *zwf* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (Paraquat). **Journal of bacteriology**. 180 (7): 1741-1749.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A. y Clark, D.P. 2012. Brock Biology of microorganisms. Editorial Benjamin Cummings, San Francisco. 105-106 p.

- May, T.B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J.D., Roychoudhury, S., Zielinski, N.A., Berry, A., Rothmel, R.K., Misra, T.K. y Chakrabarty, A.M. 1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. **Clinical microbiology reviews**. 4(2): 191-206.
- McCowen, S.M., Phibbs, P.V. y Feary, T.W. 1981. Glycerol catabolism in wild-type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Current microbiology**. 5: 191-196.
- Middaugh, J., Hamel, R., Jean-Baptiste, G., Bériault, R., Chenier, D. y Appanna, V.D. 2005. Aluminum triggers decreased aconitase activity via Fe-S cluster disruption and the overexpression of the isocitrate dehydrogenase and isocitrate lyase: a metabolic network mediating cellular survival. **The journal of biological chemistry**. 280(5): 3159-3165.
- Miller, J.H. 1972. Experiments in molecular genetics. Editorial Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 431-435 p.
- Murarka, A., Clomburg, J.M. y Gonzalez, R. 2010. Metabolic flux analysis of wild-type *Escherichia coli* and mutants deficient in pyruvate-dissimilating enzymes during the fermentative metabolism of glucuronate. **Microbiology**. 156: 1860-1872.
- Niimura, Y., Poole, L.B. y Massey, V. 1995. Amphibacillus xylanus NADH oxidase and Salmonella typhimurium alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of S. typhimurium alkyl-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component. **Journal of biological chemistry**. 270: 25645-25650.
- Nikel, P.I., Kim, J. y de Lorenzo, V. 2014. Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. **Environmental microbiology**. 16: 239-254.
- Nisselbaum, J.S. y Green, S. 1969. A simple ultramicro method for determination of pyridine nucleotides in tissues. **Analytical biochemistry**. 27: 212-217.
- Norbeck, J. y Blomberg, A. 1997. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl: Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via dihydroxyacetone pathway. **The journal of biological chemistry**. 272(9): 5544-5554.
- Nulton-Persson, A.C. y Szveda, L.I. 2001. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. **The journal of biological chemistry**. 276(26): 23357-23361.
- O'Sullivan, B.P. y Freedman, S.D. 2009. Cystic fibrosis. **The lancet**. 373(9678): 1891- 1904.
- Ochsner, U.A., Vasil, M.L., Alsabbagh, E., Parvatiyar, K. y Hassett.D.J. 2000. Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair:

oxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpCF. **Journal of bacteriology**. 182(6): 4533-4544.

Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F. y Blázquez, J. 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. **Science**. 288: 1251-1253.

Ostroff, R.M., Vasil, A.I. y Vasil, M.L. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**. 172(10): 5915-5923.

Østrup, J.P, Givskov, M., Bjarnsholt, T. y Moser, C. 2010. The immune system vs *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **FEMS Immunology & medical microbiology**. 59: 292-305.

Påhlman, A.-K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S. y Adler, L. 2001. The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular response to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. **The journal of biological chemistry**. 276(5): 3555-3563.

Palma, M., DeLuca, D., Worgall, S. y Quadri, L.E.N. 2004. Transcriptome analysis of the response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. **Journal of bacteriology**. 186: 248-252.

Pandolfi, P.P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosvel, F. y Luzzato, L. 1995. Target disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. **The EMBO journal**. 14(21): 5209-5215.

Panmanee, W. y Hassett, D. J. 2009. Differential roles of OxyR-controlled antioxidant enzymes alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF) and catalase (katB) in the protection of *Pseudomonas aeruginosa* against hydrogen peroxide in biofilms vs planktonic culture. **FEMS microbiology letters**. 295: 238-244.

Pietersen, B., Brözel, V.S. y Cloete, T.E. 1996. The response of *Escherichia coli* K12 upon exposure to hypochlorous acid and hydrogen peroxide. **Water SA**. 22(1): 43-48.

Pollak, N., Dölle, C. y Ziegler, M. 2007. The power to reduce: pyridine nucleotides – small molecules with a multitude of functions. **Biochemical journal**. 402: 205-218.

Pomposiello, P.J., Bennik, M.H. y Demple, B. 2001a. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. **Journal of bacteriology**. 183(13): 3890-3902.

Pomposiello, P.J. y Demple, B. 2001b. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. **TRENDS in biotechnology**. 19(3): 109-114.

Previllé, X., Salvemini, F., Giraud, S., Chaufour, S., Paul, C., Stepien, G., Ursini, M.V. y Arrigo, A.-P. 1999. Mammalian small stress proteins protect against oxidative stress through their ability to increase Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and by maintaining optimal cellular detoxifying machinery. **Experimental cell research**. 247: 61-78.

Ragland, T.E., Kawasaki, T. y Lowenstein, J.M. 1966. Comparative aspects of some bacterial dehydrogenases and transhydrogenases. **Journal of bacteriology**. 91(1): 236-244.

Rivers, D.B. y Blevins, W.T. 1987. Multiple enzyme forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **Journal of general microbiology**. 133(11): 3159-3164.

Røkenes, T.P., Lamark, T. y Strøm, A.R. 1996. DNA-binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: the inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation. **Journal of bacteriology**. 178(6): 1663-1670.

Rowe, J.J. y Reeves, H.C. 1971. Electrophoretic heterogeneity of Bacterial Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Specific Isocitrate Dehydrogenase. **Journal of bacteriology**. 108(2): 824-827.

Sage, A.E., Vasil, A.I. y Vasil, M.L. 1997. Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Molecular microbiology**. 23: 43-56.

Salunke, P., Töpfer, T., Buer, J. y Tümmler, B. 2005. Genome-wide transcriptional profiling of the steady-state response of *Pseudomonas aeruginosa* to hydrogen peroxide. **Journal of bacteriology**. 187(8): 2565-2572.

Salvemini, F., Franzé, A., Iervolino, A., Filosa, S., Salzano, S. y Ursini, M.V. 1999. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. **The journal of biological chemistry**. 274(5):2750-2757.

Schweizer, H.P. y Po, C. 1996. Regulation of glycerol metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of the *glpR* repressor gene. **Journal of bacteriology**. 178(17): 5215-5221.

Scott, M.D., Zuo, L., Lubin, B.H. y Chiu, D.T. 1991. NADPH, but not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. **Blood**. 77(9): 2059-2064.

Scott, M.D., Wagner, T.C. y Chiu, T.-Y. 1993. Decreased catalase activity is the underlying mechanism of oxidant susceptibility in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. **Biochimica et biophysica Acta**. 1181: 163-168.

Seaver, L.C. e Imlay, J.A. 2001. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**. 183(24): 7173-7181.

Singh, R., Bériault, R., Middaugh, J., Hamel, R., Chenier, D., Appanna, V.D. y Kalyuzhnyi. 2005. Aluminum-tolerant *Pseudomonas fluorescens*: ROS toxicity and enhanced NADPH production. **Extremophiles**. 9: 367-373.

Singh, R., Mailloux, R.J., Puiseux-Dao, S. y Appanna, V.D. 2007. Oxidative stress evokes a metabolic adaptation that favors increased NADPH synthesis and decreased NADH production in *Pseudomonas fluorescences*. **Journal of bacteriology**. 189(18): 6665-6675.

Singh, S., Anand, A. y Srivastava, P.K. 2012. Regulation and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase: A review. **International journal of plant physiology and biochemistry**. 4(1): 1-19.

Son, M.S., Matthews, Jr.W.J., Kang, Y., Nguyen, D.T. y Hoang, T.T. 2007. In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. **Infection and immunity**. 75(11): 5313-5324.

Smirnoff, N. y Cumbes, Q.J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. **Phytochemistry**. 28(4): 1057-1060.

Stewart, P.S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J.G., Lewandoski, Z., Ochsner, U.A. y Hassett, D.J. 2000. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Applied and environmental microbiology**. 66(2): 836-838.

Stinson, M.W. y Hayden, C. 1979. Secretion of phospholipase C by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and immunity**. 25(2): 558-564.

Storz, G., Tartaglia, L.A., Farr, S.B y Ames, B.N. 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. **Trends in genetics**. 6(11): 363-368.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E. Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wonge, G.K.S., WU, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock. R.E.W., Lory, S. y Olson, M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**. 406: 959-964.

- Sui, Y., Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J. y Hershekovitz, V. 2012. Pretreatment of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, with glycine betaine increases oxidative stress tolerance in the microenvironment of apple wounds. **International journal of food microbiology**. 157: 45-51.
- SUPELCO. 1997. Rapid, reliable nucleotides analyses, using SUPELCOSIL LC-18-T HPLC columns. Bulletin 913.
- Teitzel, G.M., Geddie, A., De Long, S.K., Kirisits, M.J., Whiteley, M. y Parsek, M.R. 2006. Survival and growth in presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**. 188(20): 7242-7256.
- Terry, J.M, Piña, S.E. y Mattingly, S.J. 1991. Environmental conditions wich influence mucoid conversion *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Infections and immunity**. 59:471-477.
- Tretter, L. y Adam-Vizi, V. 2000. Inhibition of Krebs cycle enzymes by hydrogen peroxide: a key role of α -ketoglutarate dehydrogenase in limiting NADH production under oxidative stress. **The journal of neuroscience**. 20(24): 8972-8979.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of physiology**. 552(2): 335-344.
- Van Delden, C. e Iglewski, B.H. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Emerging infectious diseases**. 4(4): 551-560.
- Velasco-García, R., Mujica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. y Muñoz-Clares, R.A. 1999. Rapid purification and properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**. 181(4): 1292-1300.
- Velasco-García, R., Gonzáles-Segura, L. y Muñoz-Clares, R.A. 2000. Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁺- and NAD⁺- dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemical journal**. 352: 675-683.
- Velasco-García, R., Villalobos, M.A., Ramírez-Romero, M.A., Mújica-Jiménez, C., Iturriaga, G. y Muñoz-Clares, R. 2006. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*: cloning, over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. **Archives of microbiology**. 185: 14-22.
- Wang, Y., Cao, Y.-Y., Jia, X.-M., Cao, Y.-B., Cao, P.-H., Fu, X.-P., Ying, K., Chen, W.-S. y Jiang, Y.-Y. 2006. Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. **Free radical biology & Medicine**. 40: 1201-1209.
- Wargo, M.J., Szwergold, B.S. y Hogan, D.A. 2008. Identification of two gene clusters and a transcriptional regulator required for *Pseudomonas aeruginosa* glycine betaine catabolism. **Journal of bacteriology**. 190(8): 2690-2699.

Widdel, F. 2010. Theory and measurement of bacterial growth. **Grundpraktikum Mikrobiologie, 4. Sem. (B.Sc.) Universität Bremen.**

Williams, P., Winzer, P., Chan, W.C. y Cámara, M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. **Philosophical transactions of the royal society B.** 362: 1119-1134.

Zhao, J., Baba, T., Mori, H. y Shimizu, K. 2004. Effect of *zwf* gene knockout on the metabolism of *Escherichia coli* grown on glucose or acetate. **Metabolic engineering.** 6: 164-174.

Zheng, M., Åslud, F. y Storz, G. 1998. Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. **Science.** 279(5357): 1718-1721.