



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Análisis genético y funcional de bombas de eflujo de
Stenotrophomonas maltophilia y evaluación de su
participación en fenotipos de resistencia y virulencia**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias Bioquímicas

PRESENTA:

IBQ. Diana Marisol Vázquez Enciso

TUTOR:

Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann
Ingeniería Genómica CCG - UNAM

COMITÉ TUTOR:

Dr. Víctor H. Bustamante Santillán
Dr. Adán O. Guerrero Cárdenas
IBT - UNAM

Cuernavaca, Morelos; junio del 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A close-up photograph of a rose, illuminated with a mix of teal and yellow light. The petals are layered and textured, with the teal light highlighting the lower and outer parts, and the yellow light highlighting the upper and inner parts. The background is dark, making the rose stand out.

Tesis de maestría

**Análisis genético y funcional de bombas de eflujo de
Stenotrophomonas maltophilia
y evaluación de su participación en fenotipos
de resistencia y virulencia**

Diana Marisol Vázquez Enciso

El valor de una educación universitaria no es el aprendizaje de muchos datos, sino el entrenamiento de la mente para pensar.

- Albert Einstein

Dedicatoria

Todo lo que soy y lo que seré, te lo debo a ti mamá. Me enseñaste a no faltar a mis promesas, ésta es la última que te hice. Te amo y me harás falta todos los días que me quedan por vivir. Ojalá estuvieras aquí para verla, algún día te la leo, en otra vida, en otro cielo.

Agradecimientos

A mi *Margarita, Isra, Javi, Voni* y mi amor pequeñito, *Andy*. Los amo, son lo mejor que tengo, mi ejemplo, mi motor, mi tesoro. Gracias por creer en mí, a donde sea que vaya siempre tengo a donde volver, ustedes son mi hogar.

A *Nelly, Víctor, Xavi, Yury* y *Adán*, por adoptarme y hacerme sentir en familia. Por todo su apoyo y el cariño que me dieron desde el día en que los conocí, mi mamá estuvo tan tranquila de saber que los tenía a ustedes, no tengo forma de agradecerles, cuentan conmigo siempre.

A mi familia foránea: *Grisi*, mi norteñita y protectora; *Stef*, libre y aventurera; *Cris* de alma risueña y soñadora; *Clari*, mi paisanita y guerrera; *Lei*, tan amorosa y linda y la pequeña *Xime*, la más original y creativa. Agradezco tanto tenerlas en mi vida, vamos por más aventuras juntas.

A mis compañeros de maestría: *Tommy, Salvador, Ast, Marco, Ale, Alejandrino, Vivi, Luis*. Compartimos sueños, risas, frustraciones, noches y días de replantearnos todo y de decidir si continuar en este camino. Los admiro a todos, nadie dijo que sería fácil pero encontrarme con personas increíbles como ustedes sin duda lo hizo más divertido.

A *Adán*, por confiar en mí en momentos en los que empezaba a dudar, por invitarme a tu grupo y brindarme nuevas oportunidades de crecer. Me hiciste ver las cosas con otra perspectiva y admiro tu capacidad y entusiasmo. Gracias por preocuparte, por escucharnos, por hacernos sentir parte de tu equipo. Nunca olvidaré tus palabras, te he visto formar personas, que en realidad como dices, son futuros colegas.

A mi tutor, *Pablo*, por aceptarme, darme un espacio en el laboratorio y enseñarme el mundo de las *Stenos*. Por la comprensión y el apoyo durante la pandemia y en todo lo que tuve que enfrentar después. Fue una época complicada pero siempre me hiciste saber que me ayudarías a continuar y concluir ésta etapa. Gracias infinitas.

A mis compañeros del laboratorio y al apoyo técnico de *Javier Rivera*, quién nos compartía protocolos y reactivos siempre que hacía falta. En especial a *Julio*, por tu amistad, por escucharme y acudir cuándo más lo necesité. Siempre atesoraré nuestras charlas y la compañía durante experimentos que parecían eternos y que no saldrían nunca. Y bueno, algunos no salieron pero así es esto.

A la UNAM, desde niña soñaba con estudiar en esa grandiosa universidad a la que asistió mi papá, quién con nostalgia y emoción me contaba todas sus aventuras y la gran formación que recibió. Crecí con el entusiasmo de pertenecer a esta Institución.

Al Instituto de Biotecnología, al Centro de Ciencias Genómicas y al CONACyT. Abonaron a mi crecimiento personal y profesional. Cada apoyo, cada beca y programa académico me ayudó a adquirir las herramientas con las que egreso y que planeo emplear para contribuir en mejora de la sociedad.

A la *vida*, mi guía es la naturaleza, ahí empecé a encontrar las respuestas a todo lo que me ha maravillado desde pequeña.

A la *ciencia*, me hizo despertar a ser más consciente de mi realidad, de todo lo que me rodea y una vez que lo hice no he dado marcha atrás. Es mi forma de seguir buscando respuestas. Los científicos somos simplemente seres curiosos que se sorprenden y comparten su manera de interpretar la naturaleza.

Este proyecto de investigación se realizó bajo la tutoría del Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann en el Programa de Ingeniería Genómica del Centro de Ciencias Genómicas - UNAM. Para su realización se contó con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): A1-S-11242 y de la UNAM a través de los Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA): IN209321.

Contenido

Índice de Figuras

Índice de Tablas

1	Introducción	1
1.1	Antecedentes	2
1.1.1	Patógenos oportunistas multidrogo-resistentes	2
1.1.2	Bombas de flujo	7
1.1.3	El análisis filogenómico de cepas de <i>S. maltophilia</i> sugiere el papel de las bombas de flujo en su virulencia.	12
1.1.4	Modelos <i>in vivo</i> para el estudio de la supervivencia intracelular de <i>S. maltophilia</i> en células eucarióticas.	14
1.2	Justificación y relevancia	16
1.3	Hipótesis	17
1.4	Objetivos	17
1.4.1	Objetivo general	17
1.4.2	Objetivos específicos	17
2	Materiales y métodos	18
2.1	Cepas, plásmidos y oligonucleótidos	18
2.1.1	Cultivo de cepas	18
2.2	Métodos analíticos	23
2.2.1	Perfil de resistencia a antibióticos	23
2.2.2	Cinética de crecimiento de Sm18	23
2.3	Técnicas de biología molecular	24
2.3.1	Preparación de células Sm18 electrocompetentes	24
2.3.2	Transformación y selección bacteriana	24
2.3.3	Fusiones transcripcionales al gen reportero <i>gfp</i>	25
2.3.4	Mutagénesis por integración de vector (vector integration mutagenesis, VIM)	27
2.4	Ensayos en modelos <i>in vivo</i>	27
2.4.1	Ensayos de supervivencia intracelular en <i>A. castellanii</i>	27

CONTENIDO

3	Resultados	29
3.1	Las bombas de eflujo SmeABC y SmeYZ se expresan de manera diferencial con respecto a las condiciones de cultivo.	35
3.2	Visualización de la interacción <i>in vivo</i> entre <i>S. maltophilia</i> y <i>A. castellanii</i>	38
3.3	Evaluación de la participación de SmeABC y SmeYZ en la persistencia y replicación de <i>S. maltophilia</i> en <i>A. castellanii</i>	41
3.4	Las mutantes de SmeYZ presentan una sensibilidad distinta a antibióticos con respecto a la cepa silvestre.	47
4	Discusión	49
4.1	SmeABC y SmeYZ desempeñan papeles fisiológicos distintos en <i>S. maltophilia</i> Sm18.	50
4.2	El co-cultivo de <i>A. castellanii</i> y <i>S. maltophilia</i> permite visualizar posibles eventos de supervivencia intracelular.	51
4.3	Mutantes de SmeZ no presentaron un incremento en la susceptibilidad a antibióticos	54
5	Conclusiones	56
6	Perspectivas	57
	Referencias	59
A	Biología molecular	72
B	Ensayos de cocultivo	83
C	Análisis estadístico	89

Índice de Figuras

1.1	Participación de <i>Stenotrophomonas spp.</i> en diferentes actividades biológicas	3
1.2	Mecanismos moleculares involucrados en la patogenicidad de <i>S. maltophilia</i> .	7
1.3	Representación de las diferentes familias de bombas de eflujo.	8
1.4	Participación de las bombas de eflujo tipo RND mediante el exporte de compuestos presentes en distintos entornos.	9
1.5	Análisis filogenómico de genomas de referencia y cepas aisladas de ríos y suelos de Morelos	13
1.6	Mapas genéticos de la distribución de las bombas de eflujo y genes colindantes en <i>S. maltophilia</i> Sm18	14
3.1	Mapa genético del operón SmeABC y sus genes colindantes en <i>S. maltophilia</i> Sm18.	29
3.2	Mapa genético del operón SmeYZ y sus genes colindantes en <i>S. maltophilia</i> Sm18.	30
3.3	Estrategia de obtención de transformantes de Sm18 que portan fusiones transcripcionales a <i>gfp</i>	31
3.4	Evaluación de la participación de las bombas de eflujo en condiciones de estrés implicadas en la virulencia.	33
3.5	Ensayo para evaluar de la expresión de bombas de eflujo bajo diferentes condiciones de cultivo.	34
3.6	Expresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeYZ en respuesta a la presencia de antibióticos en el medio	36
3.7	Expresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeYZ en respuesta al pH del medio.	37
3.8	Esquema de la interacción <i>in vivo</i> entre <i>S. maltophilia</i> y <i>A. castellanii</i> . . .	39
3.9	Evaluación de la persistencia de <i>S. maltophilia</i> mediante epifluorescencia a diferentes horas post-inoculación (hpi) en ensayos de co-cultivo entre <i>A. castellanii</i> y Sm18.	40
3.10	Evaluación de la replicación de <i>S. maltophilia</i> mediante epifluorescencia a diferentes tiempos post-inoculación (hpi) en ensayos de co-cultivo entre <i>A. castellanii</i> y Sm18.	41
3.11	Esquema de la contribución de las bombas SmeABC y SmeYZ de <i>S. maltophilia</i> en la invasión de un nicho intracelular eucariótico (<i>A. castellanii</i>).	42

ÍNDICE DE FIGURAS

3.12	Evaluación de la expresión de bombas de eflujo mediante epifluorescencia durante la interacción de Sm18/p327ABC con <i>A. castellanii</i>	43
3.13	Evaluación de la expresión de bombas de eflujo mediante epifluorescencia durante la interacción de Sm18/p327YZ con <i>A. castellanii</i>	44
3.14	Generación de plásmidos para la estrategia de mutagénesis por integración de vector	45
3.15	Obtención de mutantes mediante estrategia de interrupción de genes por integración de un vector.	46
3.16	Evaluación fenotípica de las mutantes obtenidas de la bomba SmeZ	48
A.1	Mapa genético del plásmido que contiene la fusión del promotor de Sme-ABC a gfp.	72
A.2	Mapa genético del plásmido que contiene la fusión del promotor de SmeYZ a gfp.	73
A.3	Mapa genético del plásmido que contiene la fusión de la región promotora extendida de SmeYZ a gfp.	74
A.4	Mapa genético del plásmido pSEVA512S implementado para la interrupción de <i>smeZ</i> mediante la estrategia de VIM.	75
A.5	Mapa genético del plásmido pEX18Tc Δ sacB_gfp + <i>smeZ'</i> implementado para la interrupción de <i>smeZ</i> mediante la estrategia de VIM.	76
A.6	Protocolo de TouchDown para amplificación de regiones promotoras: Sme-ABC, SmeYZ y SmeYZe.	76
A.7	Gel de agarosa de la amplificación por PCR de las regiones promotoras de interés con la enzima Phusion.	77
A.8	Gel de agarosa con los productos de la digestión del plásmido pSEVA327 con enzimas de restricción.	78
A.9	Gel de agarosa del PCR de regiones promotoras de interés con la enzima Taq Polymerase.	79
A.10	Gel de agarosa del PCR de colonia para identificar transformantes de <i>E. coli</i> DH5 α con los plásmidos que contienen las regiones promotoras de interés.	79
A.11	Gel de agarosa con los plásmidos construídos y extraídos de colonias transformantes de <i>E. coli</i> DH5a.	80
A.12	Gel de agarosa con los plásmidos de interés extraídos de transformantes de Sm18.	81
A.13	Geles de agarosa con amplicones de interés y digestiones del vector pSEVA512S para la estrategia de VIM.	81
A.14	Geles de agarosa con PCR de colonia para seleccionar transformantes que posean el plásmido pSEVA512S de interés.	82
B.1	Evaluación de la interacción de Sm18 y <i>E. coli</i> DH5 α con <i>A. castellanii</i> a 1 hpi, mediante epifluorescencia.	84
B.2	Evaluación de la interacción de Sm18 y <i>E. coli</i> DH5 α con <i>A. castellanii</i> a 72 hpi, mediante epifluorescencia.	85

ÍNDICE DE FIGURAS

B.3	Evaluación de la interacción de Sm18 y <i>E. coli</i> DH5 α con <i>A. castellanii</i> a 96 hpi, mediante epifluorescencia.	86
B.4	Evaluación de la expresión de bombas de flujo mediante epifluorescencia durante la interacción de Sm18 y <i>E. coli</i> DH5 α con <i>A. castellanii</i> a 1 hpi. .	87
B.5	Evaluación de la expresión de bombas de flujo mediante epifluorescencia durante la interacción de Sm18 y <i>E. coli</i> DH5 α con <i>A. castellanii</i> a 72 hpi. .	88
C.1	Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de imipenem en el medio de cultivo a las 24h.	90
C.2	Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de imipenem en el medio de cultivo a las 48h.	91
C.3	Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de tetraciclina en el medio de cultivo a las 24h.	92
C.4	Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de tetraciclina en el medio de cultivo a las 48h.	93
C.5	Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de kanamicina en el medio de cultivo a las 24h.	94
C.6	Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de kanamicina en el medio de cultivo a las 48h.	95
C.7	Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH ácido a las 24h.	96
C.8	Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH ácido a las 48h.	97
C.9	Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH neutro a las 24h.	98
C.10	Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH neutro a las 48h.	99
C.11	Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH alcalino a las 24h.	100
C.12	Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH alcalino a las 48h.	101

Índice de Tablas

2.1	Cepas utilizadas en este estudio	19
2.2	Plásmidos empleados en este estudio	20
2.3	<i>Continuación</i> Plásmidos empleados en este estudio	21
2.4	Oligonucleótidos utilizados en este estudio	22

Abreviaturas

ABC Familia Casete de Unión al Adenosin trifosfato, **ATP-Binding Cassette family**. 8, 10, 11

AVL Ameba de Vida Libre. 15

BsE Bombas de Eflujo. 2, 5, 7–10, 12, 53

DO Densidad Óptica. 23

DSF Factor Difusible de Señalización, **Diffusible Signaling Factor**. 6, 7

GFP Proteína Verde Fluorescente, **Green Fluorescent Protein**. 25

IPTG Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido. 19

LB medio de cultivo Luria-Bertani. 18, 23

MATE familia de Extrusión de Múltiples fármacos y Toxinas, **Multidrug And Toxin compound Extrusion family**. 8

MFS Superfamilia del Facilitador Principal, **Major Facilitator Superfamily**. 8, 10, 11

MOI Multiplicidad De Infección, **Multiplicity Of Infection**. 28

OMDR Organismo Multi-Drogo Resistente. 1, 4, 16

OMS Organización Mundial de la Salud. 1

PAS solución Salina para Amebas de Page, **Page's Amoeba Saline solution**. 27, 28

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa, **Polymerase Chain Reaction**. 27

PYG medio de cultivo de peptona, levadura y glucosa; **Peptone Yeast Glucose broth**. 18

QS Percepción del Cuórum, **Quorum Sensing**. 6, 7, 12

Abreviaturas

RND Superfamilia de resistencia-nodulación-división celular, **Resistance-Nodulation-cell Division superfamily**. 8–12

RPM Revoluciones Por Minuto. 18, 24

SMR Familia Pequeña de Multirresistencia, **Small Multidrug Resistance family**. 8

SOC medio de cultivo súper óptimo con represión catabólica, **super optimal broth with catabolite repression**. 24

TMP/SMX Trimetoprima/sulfametoxazol. 5, 10, 11, 13

X-Gal sustrato, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido. 19

Resumen

La resistencia bacteriana a antibióticos representa un problema de salud pública. Un organismo de creciente reconocimiento en este ámbito es *Stenotrophomonas maltophilia*, una bacteria de amplia distribución ambiental, que en entornos clínicos destaca por causar múltiples infecciones. Dentro de los factores que contribuyen a la resistencia a antibióticos de esta especie se encuentran las bombas de eflujo, proteínas transmembranales que expulsan compuestos tóxicos o nocivos. Dada su relevancia, el presente estudio consistió en realizar un análisis genético y funcional de las bombas de eflujo tipo RND SmeABC y SmeYZ, que además resultan específicas de la especie *S. maltophilia* para identificar la función potencial que mantienen en la resistencia y persistencia intracelular de este organismo.

Los resultados demostraron que SmeYZ se expresó en todas las condiciones probadas, a dos diferentes temperaturas (30°C y 37°C), diferentes pHs (5,7 y 9) y en presencia de antibióticos (imipenem, tetraciclina y kanamicina). En el caso de SmeABC no se detectó su expresión bajo estas mismas condiciones.

Se visualizó la posible persistencia y replicación de *S. maltophilia* dentro de *Acanthamoeba castellanii*, una ameba de vida libre útil para evaluar la interacción bacteria-hospedero debido a que en ambientes naturales regula la población de bacterias mediante la depredación. Adicionalmente, se detectaron escenarios que sugieren la participación de las bombas de eflujo durante la persistencia intracelular de la bacteria al ser fagocitada por la ameba. Sin embargo, es necesario dar continuidad a estos estudios implementando mejores estrategias experimentales que permitan identificar el compartimento intracelular que ocupan las bacterias y las características del mismo.

Finalmente, se obtuvieron mutantes de SmeYZ para explorar su contribución en la resistencia de *S. maltophilia*. Sin embargo, estas cepas no presentaron susceptibilidad a los antibióticos para los cuales está reportada la participación de esta bomba. Esto podría indicar que la resistencia a estos compuestos está mediada por otros mecanismos que posiblemente compensan la falta de acción de la bomba, e incluso podría tratarse de la participación de otras bombas de eflujo tal como se ha reportado en otros organismos.

Capítulo 1

Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declara que la resistencia a los antimicrobianos es un problema de salud pública [1] causado principalmente por un uso excesivo de estos compuestos en padecimientos donde no son necesarios. Además de la propagación de patógenos en ambientes clínicos, existe una preocupación creciente por la aparición de organismos multidrogo-resistentes (OMDRs) en medios extrahospitalarios, resultando en el incremento de infecciones adquiridas en comunidades. Esto demuestra la urgencia de realizar un monitoreo adecuado de OMDRs en ambientes naturales. Es necesario examinar las fuentes de aparición y los mecanismos que emplean durante la infección para comprender las razones de su diseminación en múltiples nichos.

La OMS ha publicado una lista de patógenos para los cuales es urgente la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos [2]. Destacan las bacterias Gram negativas debido al vasto repertorio de genes y mecanismos que les permiten resistir la acción de antimicrobianos. Además, se identificaron las principales especies adquiridas en un medio hospitalario: *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* [3]. Respecto a las infecciones nosocomiales transmitidas por el agua, destaca *Stenotrophomonas maltophilia* [3, 4], una gammaproteobacteria poco conocida y que constituye el objeto de estudio del presente proyecto.

El género *Stenotrophomonas* está conformado por bacterias Gram negativas de extensa distribución ambiental, siendo *S. maltophilia* la única especie conocida que causa infecciones en humanos [5, 6]. Este patógeno oportunista multidrogo-resistente, es adquirido principalmente en nichos intrahospitalarios y ha sido asociado a bacteremias y neumonía en pacientes inmunodeprimidos [7]. Su resistencia intrínseca a un amplio rango de antibióticos está asociada a diferentes factores: la baja permeabilidad de su membrana, la presencia de bombas de eflujo y la producción de β -lactamasas y otras enzimas [8].

Las bombas de eflujo (BsE) que contribuyen a la resistencia intrínseca y adquirida de esta bacteria, consisten en complejos homo o heteroméricos que han sido clasificados en seis familias estructurales. Miembros de 5 familias han sido reportadas en

Stenotrophomonas. Las BsE son capaces de expeler una variedad de compuestos, desde antibióticos hasta agentes antimicrobianos secretados por la célula huésped, como ácidos grasos, péptidos e incluso detergentes (sales biliares) [9]. Se han identificado bombas capaces de exportar moléculas señalizadoras que median la comunicación celular vía *quorum sensing* (QS) y que también participan en la formación de biopelículas, expulsando lipopolisacáridos, monosacáridos y aminoácidos [10]. Además, se ha descrito en algunas especies de bacterias, el efecto de BsE en la replicación intracelular y virulencia en distintos hospederos [11].

La importancia del presente proyecto radica en el estudio de las bombas de flujo en *S. maltophilia* para caracterizar la función potencial que mantienen en fenotipos de resistencia y virulencia, la cual ha sido escasamente explorada en esta especie.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Patógenos oportunistas multidrogo-resistentes

La resistencia bacteriana a múltiples fármacos ocurre por la acumulación de genes de resistencia en plásmidos o transposones, así como por la acción de bombas de flujo capaces de exportar más de un tipo de fármaco o compuesto antimicrobiano. Los plásmidos portadores de estos agentes son frecuentemente movilizados o conjugados de una célula a otra [12]. Múltiples genes de resistencia parecen tener orígenes evolutivos en los microbios que debían defenderse de los antibióticos presentes en su entorno, los cuales eran producidos por organismos del ambiente (microorganismos del suelo), por lo que han estado continuamente expuestos a estos compuestos a lo largo de su historia evolutiva [12].

Stenotrophomonas maltophilia

Generalidades El género *Stenotrophomonas* está filogenéticamente localizado en la clase Gammaproteobacteria. Actualmente existen 17 especies válidamente descritas incluidas en la lista de nombres procarióticos con posición en la nomenclatura (LPSN) de Jean P. Euzéby (<https://lpsn.dsmz.de/genus/stenotrophomonas>) [13, 14]. Los miembros de este género son capaces de vivir como bacterias planctónicas en cuerpos de agua o como comunidades sésiles en biopelículas, además de internalizarse en distintos tipos de células eucarióticas, como células epiteliales humanas [8, 15], células bronquiales IB3-1 [16], amebas de vida libre [17], células dendríticas [18] y macrófagos (BMDMs) [19]. A pesar de que este grupo se encuentra ubicuamente distribuido en el medio ambiente y participa en diferentes procesos (figura 1.1), sus principales reservorios son el suelo y las plantas [20]. Además, varios de sus miembros tienen un papel ecológico en los ciclos del nitrógeno y el azufre [21, 22, 23].

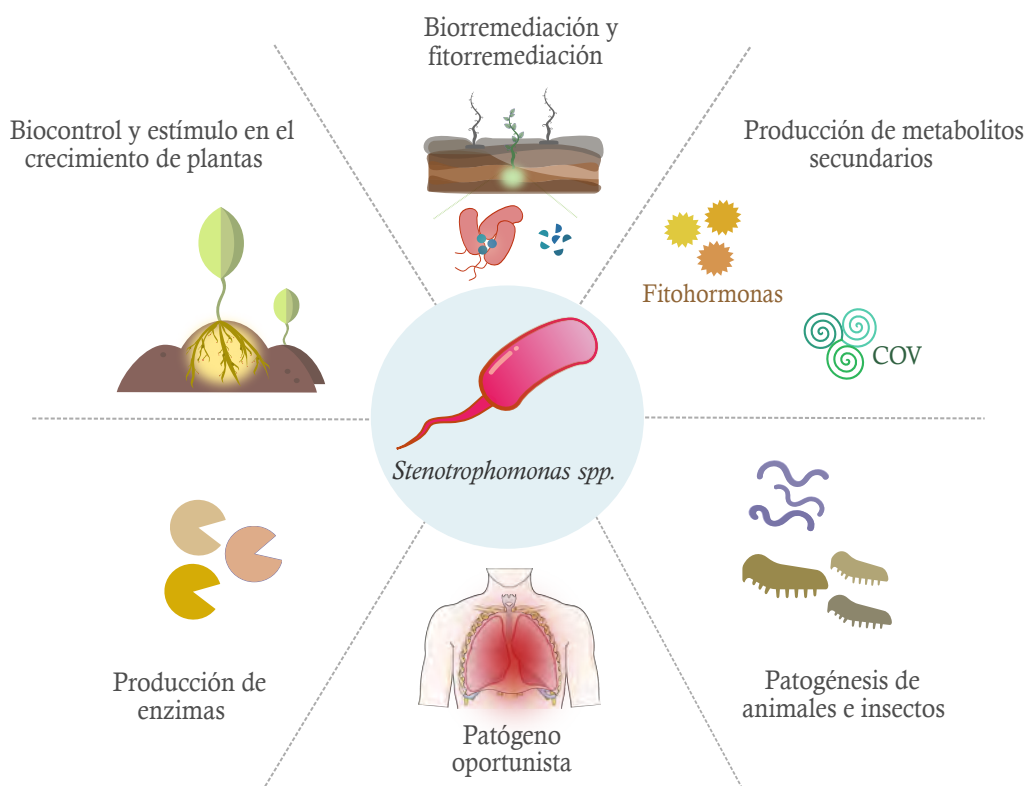


Figura 1.1: Participación de *Stenotrophomonas* spp. en diferentes actividades biológicas. En la rizósfera, la producción de metabolitos secundarios estimula el crecimiento de plantas y el biocontrol de patógenos [20]. Producen enzimas que contribuyen al biocontrol y a la colonización de hospederos e incluso algunas proteasas se han destinado al sector industrial. Su resistencia intrínseca a diferentes xenobióticos sugiere su implementación en estrategias de biorremediación y fitorremediación [20, 24]. Por otro lado, *S. maltophilia* destaca por causar infecciones nosocomiales y se ha descrito su patogenicidad en diferentes modelos. COV, compuestos orgánicos volátiles.

S. maltophilia es una bacteria ambiental Gram negativa, aerobia, motil, con forma bacilar y es capaz de persistir en ambientes acuosos con pocos nutrientes [8]. Se ha identificado en diferentes fuentes de agua (fuentes naturales: ríos y cenotes) [25], en plantas de tratamiento de aguas [25] y está implicada en infecciones nosocomiales transmitidas por el agua [6, 26, 27]. Está presente en la rizósfera de trigo, avena, pepino, maíz, patata, entre otras [28, 25] y en animales (microbiota oral de serpientes, heces de ardilla, úlceras de cerdo) [29, 30]. Su versatilidad metabólica ha atraído un interés biotecnológico para múltiples aplicaciones. Se ha sugerido como biopesticida por su actividad antagonista frente a fitopatógenos [31] y al ser capaz de degradar compuestos xenobióticos, se ha propuesto en procesos de biorremediación para la descontaminación del suelo [31]. Diferentes cepas exhiben resistencia intrínseca a metales pesados como cadmio, cobalto, zinc, mercurio y plata [20]. Esto se ha reportado tanto para cepas ambientales como clínicas

[8]. En el aislado clínico K279a se han identificado genes implicados en el importe, almacenamiento y expulsión de metales [32] y al compararla con una cepa ambiental (R551-3) de esta misma especie, se determinó que ciertos mecanismos son comunes a ambos aislados, mientras que otros solo se presentan en la cepa K279a [33].

A pesar de sus múltiples contribuciones en el medio ambiente, este organismo ha ganado principal atención debido a su clasificación como patógeno oportunista OMDR en nichos intrahospitalarios. Es capaz de causar severas infecciones en humanos por lo que el estudio de los mecanismos que emplea para la supervivencia, persistencia y patogenicidad, resultan útiles para desarrollar tratamientos eficaces contra esta bacteria.

Patogenicidad *S. maltophilia* participa principalmente en infecciones del tracto respiratorio y en enfermedades pulmonares crónico-obstructivas. Es capaz de producir bacteriemia, sepsis biliar, endoftalmitis, endocarditis, meningitis e infecciones en ojos, huesos, articulaciones, tracto urinario y tejidos blandos [8].

Los factores de riesgo de contraer una infección por esta bacteria están asociados a un estado de salud gravemente comprometido, de pacientes con hospitalización prolongada o en terapia intensiva, como quienes que sufren enfermedades crónicas y han sido expuestos a antimicrobianos de amplio espectro. Además, influye la presencia de dispositivos invasivos de uso prolongado como catéteres intravenosos o tubos de ventilación [8, 6].

Resistencia a antibióticos **Resistencia intrínseca:** los factores implicados incluyen la baja permeabilidad de su membrana, la presencia de bombas de flujo codificadas cromosómicamente y la expresión de β -lactamasas y enzimas modificadoras de antibióticos [32, 8]. Se ha sugerido que esta respuesta la ha manifestado en ambientes naturales sin intervención humana, en donde normalmente su maquinaria metabólica le permite desintoxicar y romper compuestos dañinos, y que no se debe únicamente al uso de antibióticos en entornos médicos [34, 35].

Resistencia adquirida: la adquisición de ciertos elementos puede ocurrir en un ambiente natural (rizósfera) donde existe una alta competencia, presencia de diversos antibióticos y una alta tasa de transferencia horizontal de genes [28]. Posteriormente, cuando las cepas ganan acceso a un medio clínico son capaces de retener estos genes. La resistencia adquirida por esta bacteria puede ocurrir a través de la transferencia horizontal de transposones, integrones, elementos tipo integron y secuencias de inserción y regiones comunes (ISCR, por sus siglas en inglés), especialmente cuando crece formando biopelículas [8]. Estos atributos son comunes en cepas provenientes de aislados ambientales y clínicos [36, 37], por lo que se les considera implicados tanto en la resistencia como en la invasión de diferentes hospederos. Es importante señalar que esta bacteria generalmente carece de plásmidos [14, 32, 38].

Se han reportado aislados de *S. maltophilia* resistentes a β -lactámicos, macrólidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, carbapenémicos, cloranfenicol, tetraci-

clinas, polimixinas y trimetoprima/ sulfametoxazol (TMP/SMX) [8]. Sin embargo, resulta esencial estudiar los fenotipos tanto resistentes como virulentos en un contexto filogenómico, en este sentido un estudio reveló que cepas de *S. maltophilia* provenientes de aislados ambientales exhiben multidrogo-resistencia a ceftazidima, clavulanato, gentamicina, cefepima, kanamicina y estreptomocina, además de que expresan metalo- β -lactamasas [39]. Con respecto a los mecanismos se ha estudiado que la resistencia a β -lactámicos resulta de la expresión de β -lactamasas inducibles codificadas cromosómicamente: L1 y L2. L1 consiste en una metalo- β -lactamasa mientras que L2 es una cefalosporinasa sensible a ácido clavulánico [40]. La resistencia a quinolonas esta mediada principalmente por la sobreexpresión de bombas de eflujo (en particular por SmeDEF) y posiblemente por la baja permeabilidad de su membrana externa [6]. En el caso de los aminoglucósidos, esta bacteria expresa enzimas que los modifican y posee BsE capaces de expulsarlos. Además, es capaz de alterar el tamaño del O-polisacárido y el contenido de fosfato de los lipopolisacáridos de la membrana externa dependiendo de la temperatura [6], lo que origina una variación en la susceptibilidad a estos compuestos bajo distintas condiciones.

Virulencia e invasión de células huésped Estudios de tipificación molecular sugieren que determinadas cepas de *S. maltophilia* poseen características que favorecen la colonización y la infección [5, 41] de diferentes tipos de células eucarióticas tanto epiteliales como fagocíticas.

Las especies de *Stenotrophomonas* están frecuentemente asociadas con plantas, como *S. maltophilia* y *S. rhizophila*, por lo que pueden ser aisladas de la rizósfera o de capas endófitas, principalmente de tejidos vasculares de la raíz y del tronco [42, 43]. Los miembros de este género son capaces de producir enzimas extracelulares (proteasas, lipasas, nucleasas, quitinasas y elastasas) implicadas en la colonización de plantas por otros microorganismos de la rizósfera [20].

El análisis genómico de *S. maltophilia* sugiere que se ha adaptado a la colonización humana, al haber perdido ciertos rasgos patogénicos de plantas y ganado posibles factores de virulencia [32]. Esta especie se ha destacado como un patógeno oportunista en pacientes inmunocomprometidos. En el ámbito intrahospitalario, se han estudiado los factores involucrados en su virulencia y que podrían promover su habilidad para colonizar el tracto respiratorio y diversas superficies plásticas (como catéteres o tubos endotraqueales), los cuales se mencionan en seguida y se esquematizan en la figura 1.2.

- Estructuras de adhesión y biopelículas
S. maltophilia produce diversos tipos de pili o fimbrias que le permiten competir contra otros microorganismos presentes en la superficie de raíces, así como colonizar instrumentos médicos, lo que finalmente conlleva a la infección en humanos [44]. Además, destaca su habilidad para formar biopelículas en distintas superficies (teflón, vidrio y plásticos) y para adherirse a tejidos en sus hospederos [45, 46, 47, 16]. Se estima que la matriz de biopelícula está asociada a un 65% de infecciones adquiridas en un hospital [48]. Esta especie puede formar estas estructuras por su cuenta

o en conjunto con otras, y al crecer en esa matriz, es más resistente a fagocitos y antibióticos, lo que contribuye a su virulencia [49, 50, 51, 52].

- Enzimas hidrolíticas

Este organismo produce enzimas que han demostrado estar involucradas en la patogénesis bacteriana de otros géneros. La proteasa de esta bacteria codificada por *stmPr1* es capaz de romper los componentes proteicos del colágeno, fibronectina y fibrinógeno, y así contribuir al daño tisular local y hemorragia [52]. Sobrenadantes de aislados recuperados de hígado y tráquea exhiben actividades hemolíticas y enzimáticas [8], por lo que se han estudiado aquellos con actividad citotóxica [53]. El genoma de un aislado clínico específico, *S. maltophilia* K279a, codifica para diferentes enzimas extracelulares, como proteasas, lipasas, esterases, DNAsas, RNAsas y fibrolisina [32].

- Sistemas de secreción

Un factor importante para la virulencia bacteriana es la presencia de mecanismos capaces de transportar proteínas efectoras a través de la membrana celular, ya sea al entorno circundante o dentro de una célula huésped. En el genoma del aislado K279a se han identificado distintos genes codificantes de sistemas de secreción transmembranales de tipo I, II, IV y V [32].

- Sistema del factor difusible de señalización (DSF)

S. maltophilia, al igual que otras bacterias Gram negativas, utiliza el mecanismo de *quorum sensing* (QS) para coordinar la comunicación celular y la expresión de fenotipos de colonización y patogénesis [30]. Sin embargo, no se basa en los sistemas habituales, ya que no sintetiza N-acilhomoserin lactonas (N-AHLs) [54, 55]. Su sistema se centra en el factor difusible de señalización [44] (DSF), una molécula encontrada en los mecanismos de comunicación de *Xanthomonas* y *Xylella* [56]. Esta bacteria utiliza las interacciones mediadas por este sistema para coordinar los fenotipos celulares de colonización y patogénesis. QS-DSF regula la motilidad bacteriana [56, 57, 58], la formación de biopelículas [59, 60] y la virulencia [57, 59]. Esta especie también es capaz de modificar la formación de biopelículas y la tolerancia a péptidos catiónicos antimicrobianos, como polimixina B y colistina de *Pseudomonas aeruginosa* mediante la señalización vía DSF [61, 62]. Lo anterior indica que la modulación del comportamiento bacteriano a través de la señalización interespecie mediada por DSF en esta especie, es un fenómeno que también podría ocurrir en un contexto no patogénico, como en comunidades rizosféricas o endofíticas [20].

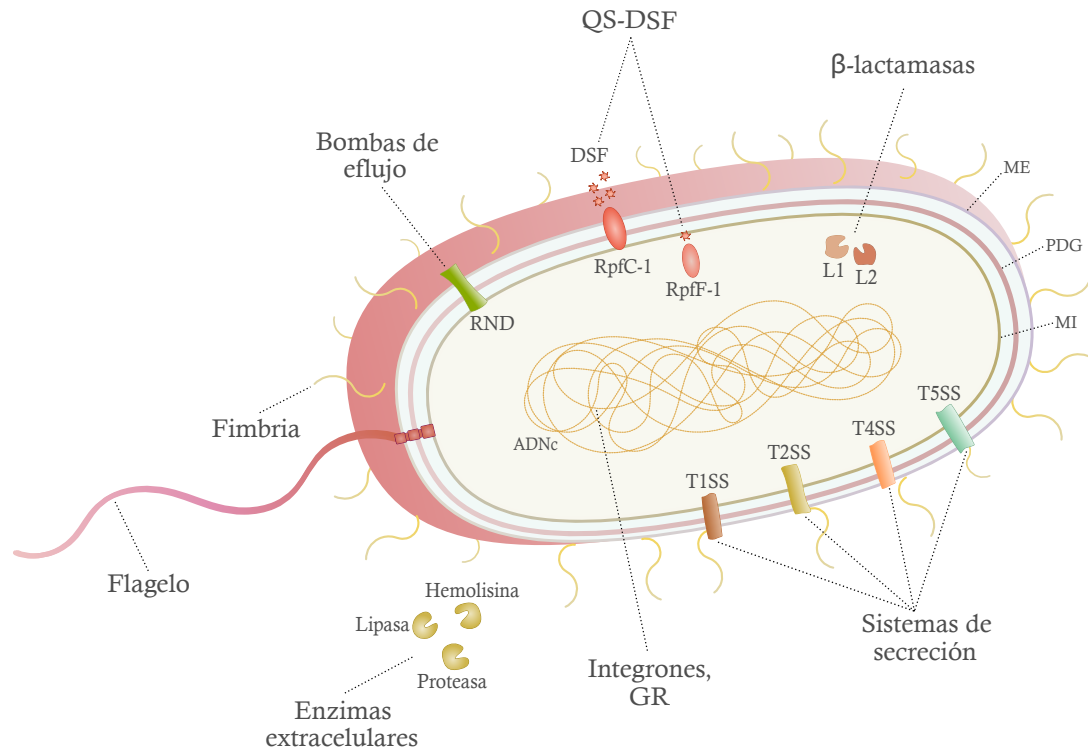


Figura 1.2: Mecanismos moleculares involucrados en la patogenicidad de *S. maltophilia*. Representación de los elementos que contribuyen en la colonización, persistencia y virulencia. Las fimbrias y flagelos le permiten colonizar diferentes medios y superficies. El daño que produce en su hospedero resulta de la acción de enzimas hidrolíticas. Las bombas participan en la resistencia a antibióticos y a compuestos secretados por el hospedero. El sistema QS-DSF coordina fenotipos de colonización y patogénesis. *S. maltophilia* codifica para dos β -lactamasas y se han identificado cuatro sistemas de secreción de factores de virulencia. Adicionalmente, su genoma contiene integrones portadores de diversos genes involucrados en la resistencia a antibióticos. ADNc, ADN cromosomal; MI, membrana interna; PDG, peptidoglucano; ME, membrana externa; GR, genes de resistencia.

1.1.2 Bombas de eflujo

Dentro de los mecanismos de resistencia se incluye la exportación de fármacos a través de las bombas de eflujo, las cuales poseen características interesantes como: su ubicuidad, ya que se encuentran en prácticamente todas las células (desde humanos a bacterias); su redundancia, debido a que una sola célula usualmente contiene más de 10 bombas distintas; la baja especificidad por sustrato, logran exportar diferentes compuestos y su expresión está altamente regulada e interconectada [11].

Las BsE son clasificadas en seis familias: Resistance nodulation cell division (RND), Major facilitator superfamily (MFS), Multidrug and toxin extrusion (MATE), Small multidrug resistance (SMR), ATP-binding cassette (ABC) y Proteobacterial antimicrobial

compound efflux (PACE) [63] (figura 1.3). La familia RND únicamente se encuentra en bacterias Gram negativas y destaca por la relevancia que mantiene en la resistencia y virulencia de diversos patógenos [64, 11]. Estos complejos consisten en una proteína de membrana interna (la bomba), un componente periplásmico y una porina o proteína de membrana externa. Su configuración tripartita les permite atravesar ambas membranas y capturar al sustrato en el espacio intracelular, transportarlo a través del periplasma y finalmente expulsarlo al medio [64].

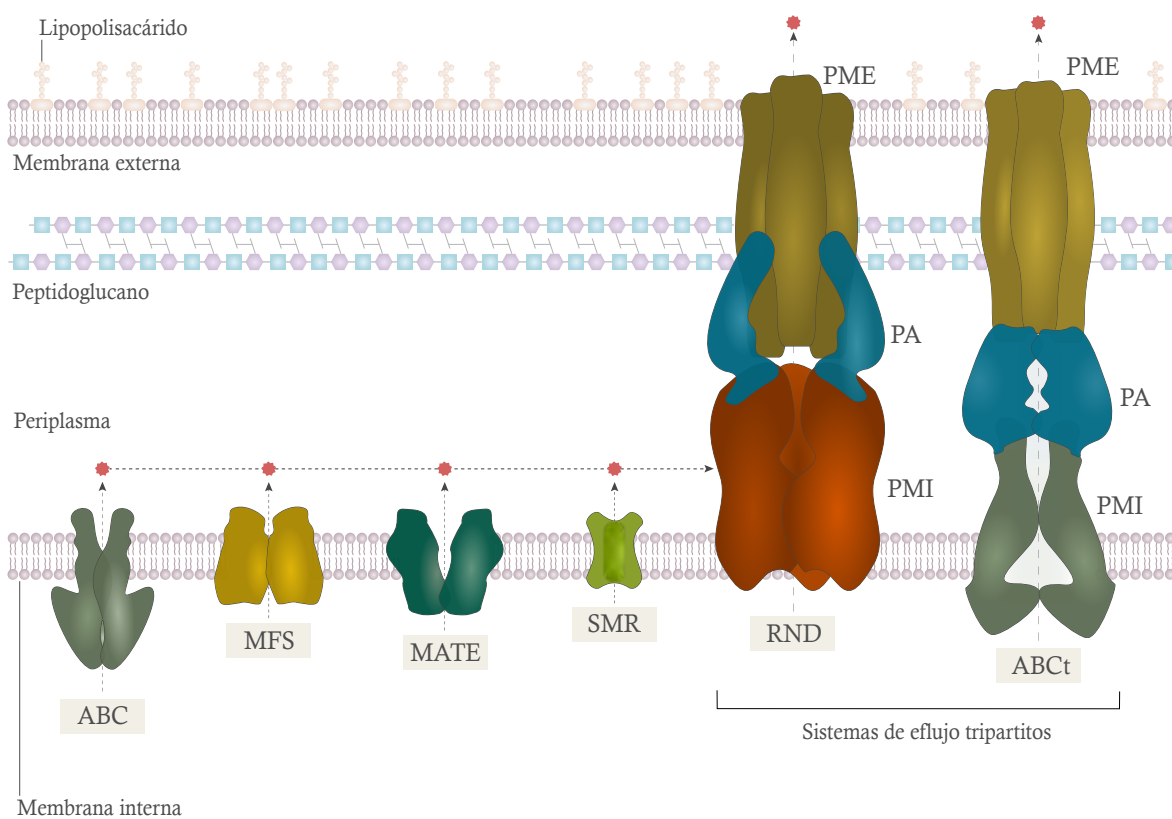


Figura 1.3: Representación de las diferentes familias de bombas de eflujo. Los miembros de ABC, MFS, MATE y SMR se encuentran acoplados a la membrana interna, por el contrario las tipo RND se agrupan en complejos tripartitos que atraviesan ambas membranas en los organismos Gram(-) y se ha descrito que ciertas ABC logran agruparse de manera similar (ABCt). Las bombas RND captan al sustrato en el citosol o desde el periplasma, una vez que han sido transportados por miembros de las otras familias y finalmente lo expulsan al medio extracelular. PMI, proteína de membrana interna; PA, proteína acopladora o de fusión; PME, proteína de membrana externa.

Inicialmente se creía que las BsE habían evolucionado como resultado de la presión selectiva ejercida por antibióticos en los ambientes microbianos. Sin embargo, se ha demostrado que estos complejos forman parte de una familia ampliamente distribuida, homólogos de estas proteínas pueden encontrarse en todos los dominios de la vida [65]. Este descubrimiento junto con características como su redundancia e inespecificidad, so-

portan la idea de que están involucradas en otros papeles fisiológicos importantes. El hecho de que los antibióticos no son los únicos sustratos descritos para estas bombas, sugiere que su función principal no consiste en transportarlos. Además, la regulación de la expresión de BsE está altamente controlada no solo por reguladores locales, también participan efectores globales que naturalmente están implicados en distintos procesos biológicos [63]. Por lo anterior, se entiende que estas bombas además de ser relevantes en la resistencia bacteriana, también son esenciales en el comportamiento que presentan los microorganismos en ambientes naturales (no-clínicos).

En entornos naturales realizan el exporte de compuestos tóxicos (metales y solventes), además contribuyen a la interacción con otros microorganismos o plantas, lo cuál puede resultar útil para competir y colonizar el medio (ej: rizósfera) [63, 66]. Se ha descrito que pueden expulsar antibacterianos producidos por plantas y otros compuestos presentes en exudados de raíces [66]. En cuanto el microorganismo se presenta en un nicho intrahospitalario, las funciones de las bombas le permiten resistir a la acción de antimicrobianos y de compuestos secretados por el hospedero (sales biliares, péptidos antimicrobianos, ácidos grasos) e incluso contribuir en procesos implicados en la virulencia [11, 63, 66] (figura 1.4).

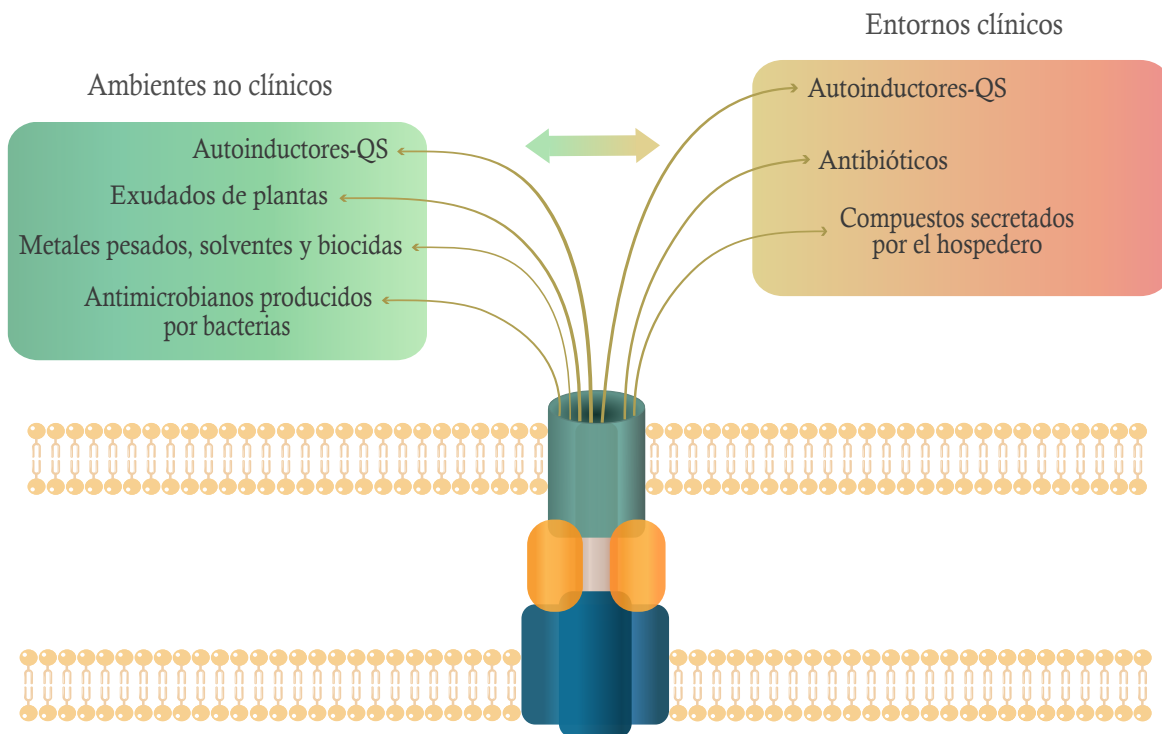


Figura 1.4: Participación de las bombas de eflujo tipo RND mediante el exporte de compuestos presentes en distintos entornos.

En el caso específico de *S. maltophilia* K279a se han identificado dos BsE tipo ABC (SmrA, MacABCsm), una MFS (EmrCABsm), una bomba novedosa extrusora de ácido fusárico (FuaABC) y finalmente, seis bombas tipo RND SmeABC, SmeEF, SmeIJK, SmeOP, SmeVWX y SmeYZ (incluyendo SmeGH y SmeMN)[40]. La exploración de las bombas pertenecientes a esta especie se ha enfocado principalmente en estudiar las funciones que mantienen en la resistencia a antibióticos y algunas se mencionan a continuación.

- Familia RND:

- SmeABC

La sobreexpresión de los genes *smeABC* confiere resistencia a aminoglucósidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas. El complejo está formado por SmeA (proteína de fusión de membrana), SmeB (bomba) y SmeC (porina). SmeC es capaz de funcionar independientemente de SmeAB, debido a que posee su propio promotor y deleciones del gen *smeC* pero no de *smeB* comprometieron la resistencia antimicrobiana [67]. Además, se ha identificado al operón *smeSR*, río arriba de *smeABC*, que codifica para un sistema de dos componentes, *smeS* corresponde al sensor histidina cinasa y *smeR* consiste en el regulador transcripcional que regula positivamente la expresión de los genes *smeABC*[67].

- SmeDEF

Conformado por una bomba (SmeE), una porina (SmeF) y una proteína de fusión de membrana periplásmica (SmeD). Está involucrada en la resistencia a quinolonas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol y novobiocina [68]. La expresión del operon *smeDEF* está regulada por el represor SmeT [69]. SmeDEF está asociada a la colonización de raíces de plantas por *S. maltophilia* ya que la deleción del gen *smeE* perjudica esta función [70].

- SmeVWX

Codificada por un operon de cinco genes (*smeU1*, *smeV*, *smeW*, *smeU2*, y *smeX*), fue identificada y caracterizada en una mutante de *S. maltophilia* KJ multidrogo-resistente. La sobreexpresión de SmeVWX resulta en un incremento en la resistencia a cloranfenicol, quinolonas y tetraciclinas y a la vez se incrementa la susceptibilidad a aminoglucósidos [71].

- SmeIJK

Los genes *smeI*, *smeJ* y *smeK* fueron identificados en *S. maltophilia* K M5. SmeI contribuye a elevar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de aminoglucósidos. SmeJ y SmeK elevan conjuntamente las CMIs de tetraciclina, minociclina y ciprofloxacino y confieren resistencia a levofloxacino [72]. Adicionalmente a la extrusión de fármacos, se ha reportado que SmeIJK cumple un papel fisiológico en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular [73].

- SmeYZ

Contribuye a la resistencia a aminoglucósidos y TMP/SMX. Un estudio ha

demostrado su importancia fisiológica y una correlación con funciones relacionadas a la virulencia, incluyendo la formación de flagelos, la susceptibilidad al estrés oxidativo, la formación de biopelículas y la secreción de proteasas. Además, la pérdida de SmeYZ incrementó la susceptibilidad de *S. maltophilia* KJ al suero humano y neutrófilos y se observó una disminución de la virulencia en un modelo murino. Estos resultados sugieren la posibilidad de la atenuación de la resistencia y virulencia de *S. maltophilia* usando inhibidores de esta bomba [74].

- SmeOP

Anteriormente se había identificado el operon *pcm-tolCsm* en *S. maltophilia* KJ2, en donde se determinó que *tolCsm* está involucrado en la resistencia a diferentes agentes antimicrobianos, incluyendo aminoglucósidos, macrólidos, β -lactámicos, cloranfenicol, ácido nalidixico, doxiciclina y TMP/SMX. Además, se demostró que la deleción de *pcm* resultó en un decremento de la expresión de *tolCsm*, lo que comprometió la resistencia del patógeno a amikacina y gentamicina [61]. Sin embargo, un estudio reciente caracterizó un clúster de cinco genes (*tolCSm-pcm-smeRo-smeO-smeP*) demostrando una asociación de SmeO y SmeP con TolCsm, para la formación de una bomba tipo RND, donde TolCsm actúa como la proteína de unión a membrana externa. Los compuestos expulsados por SmeOP- TolCsm incluyen ácido nalidíxico, doxiciclina, amikacina, gentamicina, eritromicina y leucomicina [75].

- Familia ABC:

- SmrA y MacABCsm

SmrA, fue la primera bomba de flujo de este tipo identificada en *S. maltophilia*, confiere resistencia a fluoroquinolonas y tetraciclina [76]. MacABCsm confiere resistencia intrínseca a aminoglucósidos, macrólidos y polimixinas, juega un papel importante en la regulación oxidativa y tolerancia al estrés, y en la formación de biopelículas [77].

- Familia MFS:

- EmrCABsm

Está involucrada en la expulsión de compuestos hidrofóbicos, incluyendo antibióticos como el ácido nalidíxico y eritromicina [78].

- FuaABC

Es una bomba tripartita novedosa encontrada en *S. maltophilia* que constituye una nueva subfamilia. Se ha demostrado que el operon *fuaABC* es inducido por ácido fusárico y contribuye a la resistencia a este compuesto cuando es sobreexpresada [79].

1.1.3 El análisis filogenómico de cepas de *S. maltophilia* sugiere el papel de las bombas de eflujo en su virulencia.

Dentro de las familias de BsE, los complejos RND mantienen un papel importante en la patogenicidad de organismos Gram negativos. Se atribuye su participación en la invasión de hospederos gracias a su habilidad de expulsar distintos antimicrobianos derivados del hospedero o toxinas [64]. En este sentido, recientemente ha incrementado el interés de estudiar su implicación en fenotipos de virulencia. Funciones de estas bombas asociadas al QS, la motilidad flagelar y la resistencia a ácidos grasos, sales biliares, péptidos antimicrobianos e incluso a metabolitos secundarios de plantas, han sido reportadas para varios patógenos [64]. Adicionalmente, hay evidencia que reporta su contribución en mecanismos de persistencia frente al sistema inmune del hospedero (fagocitosis) [64, 11].

En el caso de *Stenotrophomonas*, un análisis filogenómico (Vinuesa, P. et al; en prep.) (figura 1.5) en donde se incluyeron genomas de referencia así como aislados ambientales, permitió identificar la adquisición linaje-específica de bombas de eflujo (figura 1.5, A) en donde se encuentran las cepas aisladas de ríos y suelos de Morelos pertenecientes a este género [39]. Este análisis demostró que las cepas pertenecientes a la especie *S. maltophilia* poseen un mayor número de bombas de eflujo al compararlas con los aislados pertenecientes a la especie *S. acidaminiphila* o a las genopecies Smc1 y Smc2 (figura 1.5, B y C), lo que correlaciona con la resistencia y virulencia que exhibe esta bacteria ya que es la única especie reportada como patógeno humano (Vinuesa, P. et al; en prep.).

A partir de este análisis se identificó un aislado ambiental relevante (Sm18) (figura 1.5, A) perteneciente al complejo *S. maltophilia sensu stricto* en donde también se hace presente el aislado clínico K279a, que destaca por su patogenicidad [32]. La cepa fue obtenida de un ambiente caracterizado con baja contaminación antropogénica, proveniente de sedimentos del río presente en el parque natural Las Estacas en Morelos, México [39] y cuenta con genoma completo. El aislado Sm18 se eligió para ser evaluado en un modelo *in vivo* de presencia ambiental para estudiar la interacción que mantienen en este nicho.

Finalmente, se identificó la adquisición de dos BsE de tipo RND SmeABC y SmeYZ (figura 1.6) por miembros del complejo *S. maltophilia sensu lato* [14] (Vinuesa, P. et al; en prep.). Siendo esta especie la única identificada como patógeno humano y que además posee el mayor número de bombas de eflujo y genes de resistencia, se sugiere una posible contribución de las bombas en la patogenicidad exhibida por esta especie. Se decidió evaluar la participación de SmeABC y SmeYZ en fenotipos de resistencia y de replicación intracelular en células fagocíticas.

Los estudios de ambas bombas son limitados, sin embargo, se ha detectado que la sobreexpresión de SmeABC confiere resistencia a aminoglucósidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas. Su expresión es regulada positivamente por SmeR, que forma parte de un sistema de dos componentes (TCS) localizado río arriba de SmeABC y que es transcrito

de manera divergente a estos genes [67] (figura 1.6, a). Respecto a SmeYZ, confiere resistencia a TMP/SMX y aminoglucósidos y al igual que SmeABC es regulado por un sistema de dos componentes, SmeSyRy (figura 1.6, b), cuya inactivación conduce a una disminución en la expresión de SmeYZ y una sobreexpresión de SmeDEF [80]. Además, se ha demostrado que la delección de SmeYZ reduce funciones relacionadas a la virulencia como: motilidad, formación de biopelículas, susceptibilidad al estrés oxidativo, formación de flagelos y secreción de proteasas [74]. La pérdida de SmeYZ también incrementó la susceptibilidad de un aislado clínico de *S. maltophilia* al suero humano y neutrófilos, observándose una disminución de la virulencia *in vivo* en un modelo murino [74]. Lo anterior sugiere la participación de este tipo de bombas en la virulencia exhibida por esta bacteria.

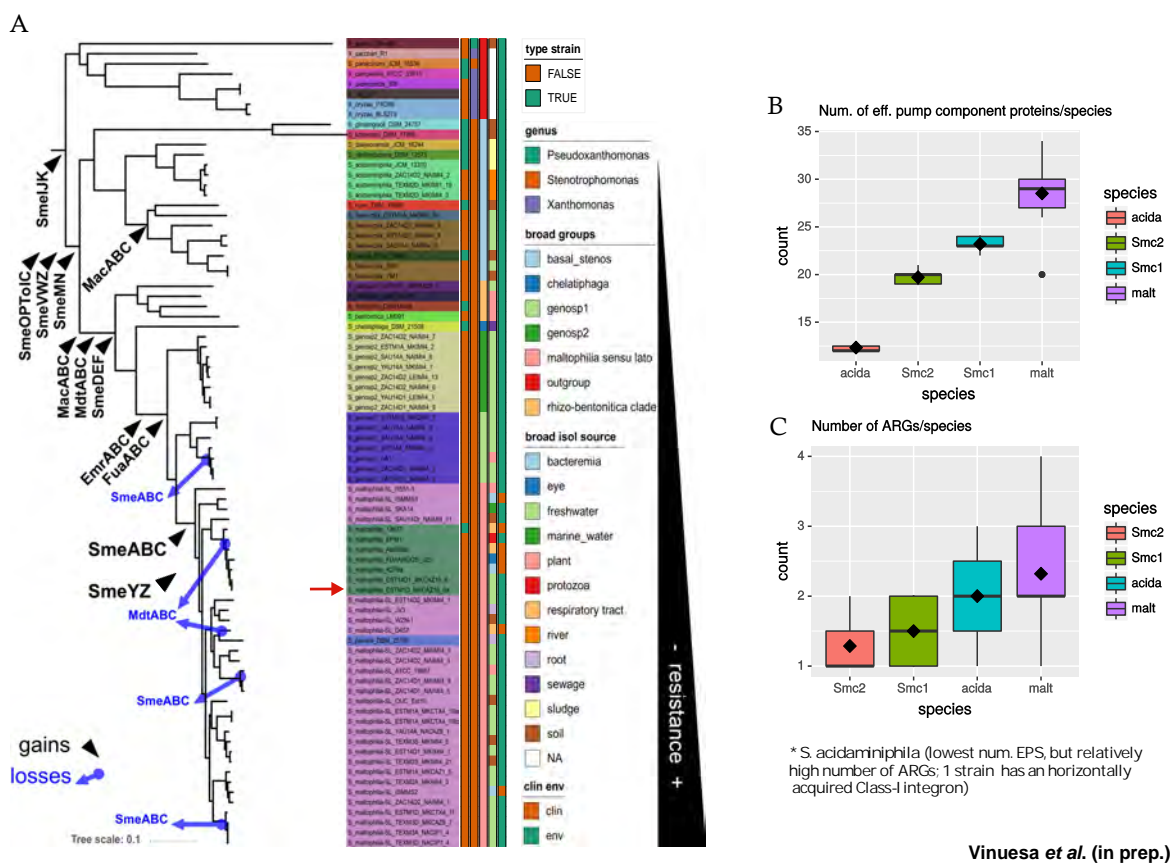


Figura 1.5: Análisis filogenómico de genomas de referencia y cepas aisladas de ríos y suelos de Morelos. A) Adquisición linaje-específica de bombas de eflujo. B) Número de componentes de bombas de eflujo por especie. C) Número de genes de resistencia por especie. La flecha roja señala la cepa Sm18.

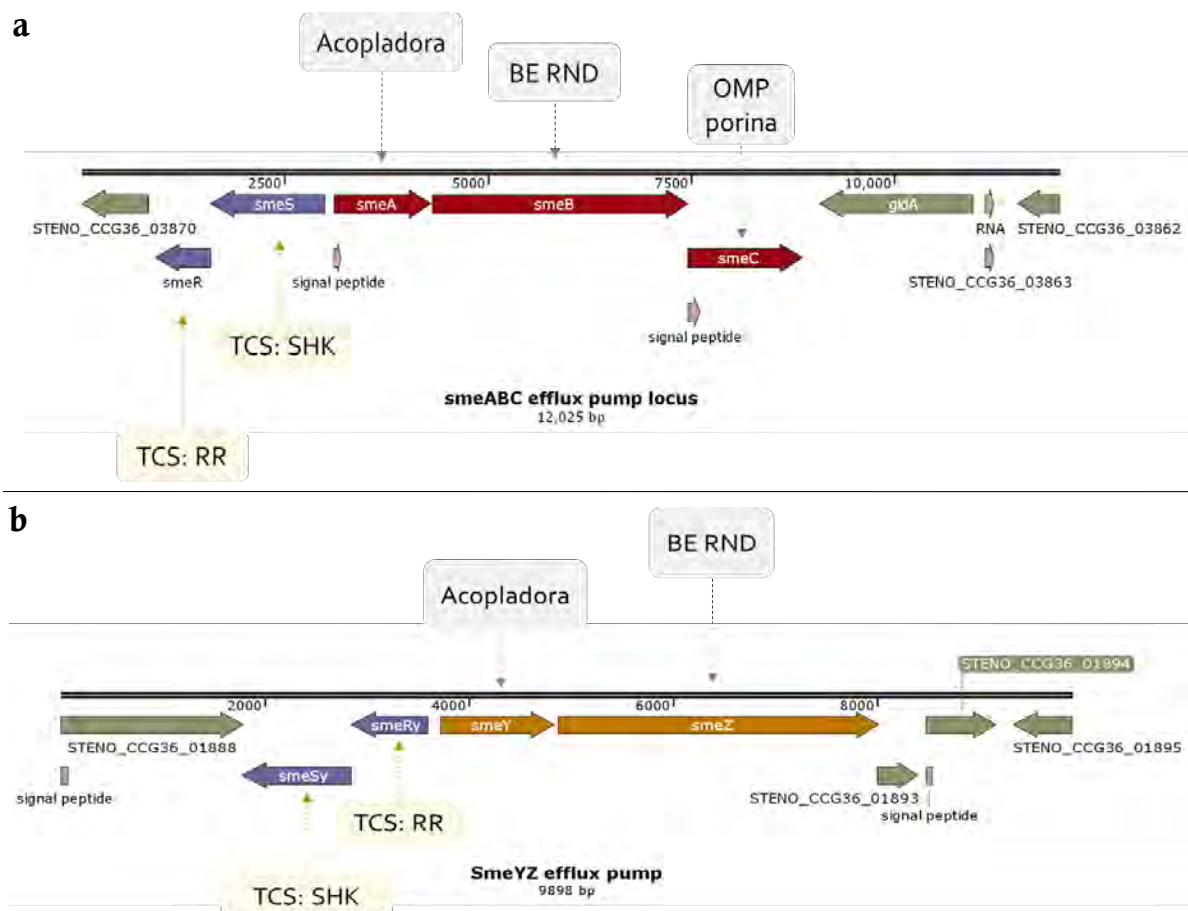


Figura 1.6: Mapas genéticos de la distribución de las bombas de eflujo y genes colindantes en *S. maltophilia* Sm18. a) Distribución del operón SmeABC y genes colindantes. b) Distribución del operón SmeYZ y genes colindantes. BE, bomba de eflujo RND; OMP, proteína de unión a membrana externa; TCS, sistema de dos componentes; SHK, sensor histidina cinasa; RR, regulador de respuesta.

1.1.4 Modelos *in vivo* para el estudio de la supervivencia intracelular de *S. maltophilia* en células eucarióticas.

Anteriormente, los modelos de mamíferos eran primordiales para el estudio de infecciones microbianas, sin embargo, han incrementado las preocupaciones éticas sobre su uso. Además, su mantenimiento resulta costoso y laborioso, dada la necesidad de varios individuos para obtener datos estadísticamente relevantes [81]. Por estas razones se ha optado por modelos alternativos como: *Acanthamoeba castellanii* (ameba de vida libre), *Artemia salina* (crustáceo), *Caenorhabditis elegans* (lombriz intestinal), *Danio rerio* (pez cebra), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Galleria mellonella* (polilla de la cera) [81]. Algunos ya han sido implementados para el estudio de la virulencia de *S. maltophilia*, como *C. elegans*, *G. mellonella* y *D. rerio* [82, 83].

***Acanthamoeba castellanii*, una ameba de vida libre como modelo para evaluar la supervivencia intracelular de *S. maltophilia*.**

Las amebas son organismos modelo para el estudio de las interacciones microbio-hospedero, principalmente por su relación con bacterias con las que comparten un mismo nicho. Las amebas de vida libre (AVL) son protistas unicelulares presentes en el suelo y agua. Sobreviven bajo privación de alimento y en condiciones adversas, como pH extremo, presión osmótica y diferentes temperaturas. La mayoría exhiben dos etapas de desarrollo. En condiciones favorables se encuentran en un estado metabólicamente activo, llamado trofozoíto, y cuando el medio se vuelve adverso, son capaces de enquistarse [84]. Son predadores naturales de bacterias, hongos, levaduras, algas e incluso de otras amebas.

En el contexto ambiental, las AVL y los fagos representan la principal presión selectiva que modula a las poblaciones bacterianas [85]. La vía de depredación de bacterias comprende la fagocitosis y la digestión dentro de fagolisosomas y hay autores que consideran a las amebas como un tipo de “macrófagos” ancestrales porque comparten similitudes microbicidas, como la presencia de un pH ácido e hidrolasas en los fagolisosomas [86]. Sin embargo, algunas especies de bacterias han desarrollado estrategias para escapar o evitar la vía fagocítica (impiden la fusión del fagosoma con el lisosoma) después de la internalización, logrando sobrevivir, replicar y finalmente salir de la AVL [87]. Entre estos organismos, se han identificado a patógenos humanos, patógenos emergentes e incluso especies consideradas inofensivas.

Las AVL pueden proveer un nicho replicativo y actuar como reservorios para bacterias debido a que en forma de quiste son capaces de “protegerlas” una vez que se han internalizado. La larga interacción entre amebas y bacterias en el entorno natural, probablemente ha seleccionado algunos rasgos de virulencia bacteriana que conducen a la adaptación hacia un sistema de vida intracelular, permitiendo que algunas especies desarrollen la habilidad de infectar y crecer dentro de células fagocíticas de mamíferos. Por esta razón, se ha empleado a una AVL como *Acanthamoeba castellanii* para identificar su posible interacción con algunos patógenos humanos como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* [88], *Vibrio cholerae* [89], *Legionella pneumophila* [90], *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri* y *Shigella sonnei* [91], entre otros.

A. castellanii es frecuentemente encontrada en suelos y medios acuáticos y presenta el ciclo de vida bifásico, como trofozoito y quiste [92]. En su interacción con *S. maltophilia*, un estudio demostró la habilidad de algunas cepas para multiplicarse dentro de *A. castellanii* y *Willaertia magna* [93]. Esto sugiere que en el medio ambiente, *S. maltophilia* es capaz de infectar y proliferar en AVLs, apoyando la idea de que estos organismos fagocíticos actúan como reservorios y vectores para la transmisión de esta especie. La bacteria podría usar a la ameba como un “campo de entrenamiento” para resistir la acción de macrófagos humanos, tal como se ha estudiado para *L. pneumophila* [86] o para incrementar sus propiedades de virulencia y resistencia a antibióticos [94].

Con respecto a la participación de las BsE como mecanismos de respuesta frente a las condiciones que experimenta una bacteria dentro de un hospedero, algunos estudios han descrito que intervienen en la respuesta al estrés nitrosativo y oxidativo producido por células del sistema inmune del hospedero [64]. Un ejemplo consiste en MexEF-OprN una bomba RND de *P. aeruginosa* que se sobreexpresa en respuesta a ambos tipos de estrés [95]. Adicionalmente, el pH también juega un papel importante dentro de células o vesículas fagocíticas, en donde se mantienen valores bajos ($\text{pH} \sim 5.5$) [96].

Un cambio de pH a un entorno ácido o alcalino, puede resultar estresante para la bacteria [97], como se ha reportado para *E. coli*, que responde activando la respuesta SOS y de choque térmico [98, 99, 100]. Los entornos alcalinos también se hacen presentes en ambientes naturales y dentro de un organismo hospedero [101, 97]. Se ha identificado que *S. maltophilia* está presente en la microbiota intestinal en algunos animales [25], en donde los valores de pH oscilan entre $\sim 6.7-7$ [102]. Además, las bacterias encuentran valores de pH superiores a 7 cuando pasan a través del tracto intestinal de un hospedero humano: $\text{pH} \sim 8.5$ [103] o de insectos: $\text{pH} \geq 10$ [104, 105]. Resulta interesante evaluar las implicaciones de las BsE en respuesta a estas condiciones. Existen estudios que muestran la actividad pH dependiente de algunas BsE [106, 107]. En el caso de *E. coli* dos sistemas de eflujo Tet(L) y MdfA le confieren tolerancia alcalina a la bacteria [101]. Otro estudio revela que el sistema genético que regula la actividad de la bomba RND AcrAB-TolC, es pH dependiente [108]. Esta bomba también participa en la resistencia y virulencia exhibida por *E. coli* y *Enterobacter cloacae* [64, 109].

Por lo anterior, *A. castellanii* es útil para estudiar especies de bacterias adaptadas a vivir intracelularmente y para entender las interacciones patógeno-hospedero.

1.2 Justificación y relevancia

El incremento de infecciones causadas por los OMDRs es alarmante. En ambientes intrahospitalarios los principales afectados son pacientes inmunodeprimidos. En estos casos, el tratamiento puede complicarse, causando que las probabilidades de éxito terapéutico se reduzcan y se originen escenarios donde se detecten bacterias resistentes a antibióticos. Así surge la creciente necesidad de detectar y estudiar a estos organismos, uno de los cuales representa el objeto de estudio de este proyecto.

Las infecciones causadas por *S. maltophilia* son complicadas de contener debido a la resistencia que presenta a múltiples antibióticos: β -lactámicos, macrólidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, amino-glucósidos, carbapenémicos, cloranfenicol, tetraciclinas y polimixinas [8, 20]. Los ensayos se han centrado en evaluar los mecanismos que emplea durante la resistencia a antibióticos, en donde las bombas de eflujo desempeñan un papel relevante. Sin embargo, la diversidad y función del repertorio de bombas en aislados de *S. maltophilia*

y su posible contribución en la virulencia, son aspectos que no han sido completamente explorados. La importancia de su estudio es comprender sus papeles fisiológicos, principalmente aquellos asociados a la colonización de hábitats, como la invasión y replicación intracelular en células eucarióticas (desde amebas hasta células humanas).

Una aproximación útil para atender la problemática expresada es explorar la relación patógeno-hospedero en modelos *in vivo*. La finalidad es estudiar el papel de las BsE no solo en la resistencia, también en la replicación en entornos intracelulares y virulencia. El uso de *A. castellanii* como modelo de interacción con *S. maltophilia*, permitirá contribuir para evaluar si la bacteria es capaz de resistir a la digestión y de replicar dentro de este organismo. Además, existe el planteamiento de que los mecanismos de patogenicidad fueron adquiridos ancestralmente en medios naturales y no se deben exclusivamente al uso indiscriminado de antibióticos [8], por lo que es de suma importancia estudiar la interacción entre organismos que comparten los mismos entornos ambientales, incluso aquellos con una ausente o mínima intervención humana.

1.3 Hipótesis

Las bombas de eflujo SmeABC y SmeYZ específicas de *S. maltophilia* contribuyen a su resistencia a antibióticos y a su capacidad de supervivencia en células fagocíticas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Realizar un análisis genético y funcional de las bombas de eflujo SmeABC y SmeYZ en *S. maltophilia* para determinar su expresión y contribución en fenotipos de resistencia y supervivencia intracelular en trofozoitos de *A. castellanii*.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la expresión de SmeABC y SmeYZ bajo condiciones de estrés que simulen entornos a las que podría enfrentarse *S. maltophilia* al colonizar un hospedero.
2. Visualizar la interacción *in vivo* de *S. maltophilia* y *A. castellanii* para evaluar la supervivencia y replicación intracelular de la bacteria.
3. Evaluar la participación de SmeABC y SmeYZ en la persistencia de *S. maltophilia* en *A. castellanii*.
4. Determinar si SmeABC y SmeYZ contribuyen a la resistencia a antibióticos de *S. maltophilia*, al comparar cepas mutantes de ambas bombas con respecto a la cepa silvestre.

Capítulo 2

Materiales y métodos

2.1 Cepas, plásmidos y oligonucleótidos

Cada colección se describe en las tablas 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4, respectivamente.

2.1.1 Cultivo de cepas

El cultivo líquido de cepas de *S. maltophilia* ESTM1D_MKCAZ16_6a (Sm18) se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio LB o en tubos de vidrio con 3 mL de LB y se incubaron a 30 °C y 200 RPM. La inoculación en medio sólido se realizó en cajas de LB con agar al 1.5% y se incubaron a 30 °C.

Las cepas de *E. coli* utilizadas (DH5 α y DH5 α λ pir) se cultivaron en tubos de vidrio con 3 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C y 200 RPM para los cultivos líquidos y en medios sólidos de LB con agar al 1.5%.

Los trofozoítos de *Acanthamoeba castellanii* ATCC[®] 30010[™] se cultivaron en medio PYG a 30 °C sin agitación en frascos T25.

Tabla 2.1: Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción
<i>E. coli</i> DH5 α	<p>Desarrollada por D. Hanahan (1985) como un vector de clonación. Posee múltiples mutaciones que permiten transformaciones de alta eficiencia [110]. F-λ-<i>endA1glnX44</i>(AS)<i>thiE1 recA1 relA1 spoT1 gyrA96</i>(NalR)<i>rfbC1 deoR nupG</i> ϕ80(<i>lacZ</i>Δ<i>M15</i>) Δ(<i>argF-lac</i>)U169 <i>hsdR17</i>(<i>rK-mK+</i>) [111]</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>lacZ</i>ΔM15: Delección parcial del gen <i>lacZ</i> (β-galactosidasa), lo que permite la α-complementación y la diferenciación blanco/azul de colonias en medio sólido con X-Gal/IPTG. • <i>endA</i>: Mutación en el gen de la endonucleasa I inespecífica. Mejora la calidad del ADN plasmídico aislado. • <i>recA1</i>: Mutaciones en genes implicados en la recombinación del ADN.
<i>E. coli</i> DH5 α λ pir	<i>E. Coli</i> DH5 α que expresa el gen <i>pir</i> a partir de una copia lisógena del fago λ pir. Diseñada para la propagación de plásmidos con el origen de replicación R6K [112, 111].
Sm18	ESTM1D_MKCAZ16.6a: Cepa de <i>S. maltophilia</i> proveniente de un aislado de sedimentos de las estacas [39].
Sm18sZ	Sm18 <i>smz</i> ::pXsZ (<i>smz</i> interrumpido por inserción del vector pEX18Tc Δ sacB_gfp_sZ vía recombinación homóloga)[Este estudio].
Sm18sA	Sm18 <i>smmA</i> ::pXsA (<i>smmA</i> interrumpido por inserción del vector pEX18Tc Δ sacB_gfp_sA vía recombinación homóloga)[Este estudio].
Sm18sQ	Sm18 <i>smmQ</i> ::pXsQ (<i>smmQ</i> interrumpido por inserción del vector pEX18Tc Δ sacB_gfp_sQ vía recombinación homóloga)[Este estudio].
Neff	<i>Acanthamoeba castellanii</i> ATCC [®] 30010 [™]

Tabla 2.2: Plásmidos empleados en este estudio

Plásmidos	Descripción	Referencia
pSEVA327	Vector de amplio rango de hospedero, sin promotor, empleado para la fusión transcripcional a <i>gfp</i> ; oriV(RK2); oriT. CmR.	Lab. Vinuesa
pSEVA355	Vector de amplio rango de hospedero, sin promotor, empleado para la fusión transcripcional a <i>lacZ</i> ; ori(RFS1010); oriT. CmR.	Lab. Navarro, Llorens
pSEVA537_PEM7	Vector de amplio rango de hospedero. Contiene a <i>gfp</i> bajo el promotor constitutivo PEM7; oriV(pBBR1); oriT. TetR.	Lab. Vinuesa
p327ABC	Derivado de pSEVA327, contiene la región promotora de <i>smeABC</i> de Sm18 río arriba de <i>gfp</i> .	Este estudio
p327YZ	Derivado de pSEVA327, contiene la región promotora de <i>smeYZ</i> de Sm18 río arriba de <i>gfp</i> .	Este estudio
p327YZe	Derivado de pSEVA327, contiene una región promotora más amplia (extendida) de <i>smeYZ</i> de Sm18 río arriba de <i>gfp</i> .	Este estudio
p355ABC	Derivado de pSEVA355, contiene la región promotora de <i>smeABC</i> de Sm18 río arriba de <i>lacZ</i> .	Este estudio
p355YZ	Derivado de pSEVA355, contiene la región promotora de <i>smeYZ</i> de Sm18 río arriba de <i>lacZ</i> .	Este estudio
pX Δ <i>sacB</i> _Pem <i>gfp</i>	Derivado de pEX18Tc, se eliminó a <i>sacB</i> y se insertó Pem_ <i>gfp</i> . oriV(ColE1), oriT, TetR.	Lab. Vinuesa
pXsZ	Derivado de pEX18Tc Δ <i>sacB</i> . <i>gfp</i> , contiene la región homóloga (VIM <i>smeZ</i>) al gen a interrumpir <i>smeZ</i>	Este estudio
pXsA	Derivado de pEX18Tc Δ <i>sacB</i> . <i>gfp</i> , contiene la región homóloga (VIM <i>smmA</i>) al gen a interrumpir <i>smmA</i>	Este estudio
pXsQ	Derivado de pEX18Tc Δ <i>sacB</i> . <i>gfp</i> , contiene la región homóloga (VIM <i>smmQ</i>) al gen a interrumpir <i>smmQ</i>	Este estudio

Tabla 2.3: *Continuación* Plásmidos empleados en este estudio

Plásmidos	Descripción	Referencia
pSEVA512S	Vector de estrecho rango de hospedero, usado para estrategia de delección de genes; oriV(R6K); oriT; fragmento <i>lacZ</i> α con dos sitios de reconocimiento para la endonucleasa I-SceI. TetR: Confiere resistencia a tetraciclina	[113]
p512S_smeZ	Derivado de pSEVA512S, contiene la región homóloga (VIMsmeZ) al gen a interrumpir <i>smeZ</i> .	Este estudio
p512S_smmQ	Derivado de pSEVA512S, contiene la región homóloga (VIMsmmQ) al gen a interrumpir <i>smmQ</i> .	Este estudio
p327sC	Derivado de pSEVA327, contiene la región promotora de <i>smmC</i> de Sm18 río arriba de <i>gfp</i> .	Este estudio
p355sC	Derivado de pSEVA355, contiene la región promotora de <i>smmC</i> de Sm18 río arriba de <i>lacZ</i> .	Este estudio

Tabla 2.4: Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Nombre	Secuencia (5'– 3')	Descripción
Sm18_P_smeABC.F	ATATAGAATTCAATACCGTTCACTGCCAGC	Amplifica región promotora de <i>smeABC</i> . Fwd Sitio de corte: EcoRI
Sm18_P_smeABC.R	TATGGATCCTGACCTGTCTTGACCTGCTG	Amplifica región promotora de <i>smeABC</i> . Rev Sitio de corte: BamHI
Sm18_P_smeYZ.F	AAAAAGAATTGCCTCATCCTCGACGATCAG	Amplifica región promotora de <i>smeYZ</i> . Fwd Sitio de corte: EcoRI
Sm18_P_smeYZ.R	TTTGGATCCCACCTGGGCACGGATCTG	Amplifica región promotora de <i>smeYZ</i> . Rev Sitio de corte: BamHI
Sme18_SmeSProm.F	ATATGAATTTCGAGTTGTACGTCGAGCAGG	Amplifica región promotora extendida de <i>smeYZ</i> . Fwd Sitio de corte: EcoRI
Sm18_SmeY_prom.R	ATATAAGCTTCGGATCGATCTGGAACAGGG	Amplifica región promotora extendida de <i>smeYZ</i> . Rev Sitio de corte: HindIII
Sm18_VIMsmeZ.F	ATATGGATCCGCGATCTTCATCATCCTGGC	Amplifica región homóloga a <i>smeZ</i> . Fwd Sitio de corte: BamHI
Sm18_VIMsmeZ.R	ATATAAGCTTCAGCTCCTCGATGATGTTGC	Amplifica región homóloga a <i>smeZ</i> . Rev Sitio de corte: HindIII
Sm18_VIMsmmQ.F	AAAAAGCTTGAAGAACGTGCCACCTACCT	Amplifica región homóloga a <i>smmQ</i> . Fwd Sitio de corte: HindIII
Sm18_VIMsmmQ.R	AAAGGATCCTACCCAGTACGGCTTCATGG	Amplifica región homóloga a <i>smmQ</i> . Rev Sitio de corte: BamHI

2.2 Métodos analíticos

2.2.1 Perfil de resistencia a antibióticos

Este ensayo se realizó para confirmar y complementar un estudio previo de caracterización de la cepa Sm18 con respecto a su perfil de resistencia a aminoglucósidos (Gentamicina y Kanamicina). Además, se seleccionaron antibióticos (Tetraciclina y Cloranfenicol) de acuerdo a los cassettes de resistencia de los plásmidos en los que se construyeron las fusiones transcripcionales (ej: pSEVA327, CmR confiere resistencia a cloranfenicol). De esta manera se determinó la concentración adecuada para identificar a las transformantes de Sm18.

El ensayo de dilución en tubo es un método útil para determinar la resistencia que presenta un aislado bacteriano a un determinado antibiótico. Se parte de una concentración bacteriana conocida ($DO = 1$) y posteriormente se realizan diluciones seriadas manteniendo el mismo factor de dilución ($F=10$) en cada paso (10-fold dilutions). Esto permitió diluir la concentración bacteriana en un orden de magnitud con cada dilución, por ejemplo: desde 10^{-1} hasta 10^{-6} . De esta manera es posible obtener colonias aisladas, hacer un conteo y determinar la concentración de bacterias viables (UFC/mL) para su análisis y comparación con otros aislados o antibióticos. Finalmente, es posible obtener la concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento bacteriano.

Se prepararon soluciones de antibióticos (Tetraciclina, Tc; Cloranfenicol, Cm; Kanamicina, Km; Gentamicina, Gm) a una concentración de 10 mg/mL (solución madre, *stock*). Posteriormente, se calculó el volumen necesario del stock para obtener la concentración deseada en 100 mL de medio LB: Tc (10, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$), Cm (20, 25, 30, 35 y 40 $\mu\text{g/mL}$), Km (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$), Gm (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$). A continuación, se añadió el volumen calculado a cada matraz y se vació el contenido en cajas Petri estériles. Adicionalmente, se prepararon cajas control con medio LB sin antibiótico. Una vez que el medio se solidificó, se sometieron a prueba de esterilidad dejándolas a temperatura ambiente por 24h. El cultivo de Sm18 se ajustó a una densidad óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) igual a 1 y a partir de éste, se realizaron diluciones seriadas con Tween 40 + MgSO_4 10 mM. Se colocaron 20 μL de cada dilución en una caja de medio LB+antibiótico. Este proceso se repitió para cada concentración y también se inoculó una placa control. Finalmente, las cajas se incubaron a 30 °C hasta observar el crecimiento de colonias, se realizó un conteo de aquellas que se observaran aisladas y se tomó registro de la dilución correspondiente.

2.2.2 Cinética de crecimiento de Sm18

Se partió de un inóculo nocturno ($\approx 12\text{h}$) de Sm18 en medio LB a las condiciones anteriormente descritas (sección 2.1.1) y se midió la DO_{600} . Se calculó el volumen de inóculo necesario para obtener una DO_{600} cercana a 0.1 en 100 mL de LB en cada matraz, esto se hizo por triplicado. Se incubaron los matraces y se realizó la medición de la

DO₆₀₀ cada hora para hacer el seguimiento de la cinética de crecimiento. Adicionalmente, se tomó una alícuota del cultivo cada dos horas para realizar diluciones seriadas. Se inocularon 20 μL de cada dilución por triplicado en medio LB sólido. Se incubaron las placas a 30 °C por 24h. Finalmente, se realizó el conteo de las colonias aisladas presentes en cada dilución y se calculó la concentración celular en unidades formadoras de colonias (UFC) por mL.

2.3 Técnicas de biología molecular

2.3.1 Preparación de células Sm18 electrocompetentes

La preparación del inóculo de la cepa Sm18 se realizó en 5 mL de LB y se incubó toda la noche a 30 °C y 200 RPM (sección 2.1.1). Al día siguiente, se tomaron 2.5 mL del inóculo y se añadieron a 100 mL de LB. El matraz se incubó a las condiciones ya mencionadas hasta alcanzar una DO₆₀₀ \approx 0.8. Posteriormente, se vació el contenido en tubos Falcon estériles de 50 mL y se separó la fracción celular de la suspensión por centrifugación a 10,000 RPM a 4 °C durante 10 min. La pastilla celular obtenida se resuspendió en 35 mL de glicerol frío al 10% y se centrifugó (10,000 RPM, 4 °C, 10 min). Se descartó el sobrenadante y el paso anterior se repitió dos veces más. La pastilla resultante de los tres lavados se resuspendió en 1.5 mL de glicerol frío al 10 % y se hicieron alícuotas de 50 μL en tubos estériles de microcentrífuga de 1.5 mL. Los tubos se almacenaron a -70 °C.

2.3.2 Transformación y selección bacteriana

Electroporación: las células electrocompetentes se descongelaron en hielo y se mezclaron con el plásmido de interés (cuantificado y analizado en el NanoDrop). Se incluyó un control negativo de puras células y se les aplicó el mismo tratamiento. En algunos casos, se empleó un plásmido previamente caracterizado como control positivo. Cada muestra se incubó en hielo durante 5 min y enseguida se transfirió su volumen a una celda para electroporar estéril de 2 mm (Bio-Rad). Se aplicó un pulso de 2.5 kV (12.5 kV/cm) en un electroporador (Bio-Rad). Posteriormente, se añadió 1 mL de medio SOC a la celda y después de mezclarlo con la suspensión, se trasladó a un tubo de vidrio estéril y se incubó a 30 °C, 200 RPM por 1h. Finalmente, la suspensión celular se sembró en medio sólido (LB o LB+antibiótico).

Choque térmico: se descongelaron células quimiocompetentes (preparadas previamente con lavados de cloruro de calcio) en hielo, se utilizó una alícuota para cada plásmido, producto de ligación o muestra control. En seguida, se añadió el plásmido y se mezcló con la suspensión celular. Se incubó en hielo por 40 minutos y posteriormente se realizó un choque térmico durante 2 min a 42 °C para después mantenerlas en hielo por 5 min. Se añadió 1 mL de LB para resuspender la muestra y el volumen total se transfirió a un tubo de vidrio estéril. Se incubó a 37 °C, 200 RPM por 1.5 h. Finalmente, la suspensión celular se inoculó en medio sólido (LB o LB+antibiótico).

Selección de transformantes: Posterior a la incubación, se recuperaron colonias aisladas producto de la transformación y se analizaron por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR de colonia) y después mediante electroforesis en geles de agarosa se detectó la presencia del inserto (región de ADN de interés). Para el PCR de colonia, se tomaron colonias aisladas y se depositaron en tubos Eppendorf de 0.2 μL y se disolvieron con 50 μL de H_2O grado biología molecular estéril, después se pusieron a 95 $^\circ\text{C}$ en un equipo Thermomixer por 15 min y transcurrido ese tiempo se tomó 1 μL del lisado como templado. Posteriormente, se preparon cultivos de las colonias seleccionadas y se realizó extracción de ADN plasmídico (ADNp) para realizar digestiones y comprobar que efectivamente contenían el inserto con el tamaño esperado. Finalmente, se prepararon alícuotas de cada cultivo con glicerol al 100% para su criopreservación a -70 $^\circ\text{C}$ (gliceroles). Nota: Adicionalmente a las técnicas de biología molecular, aquellas cepas transformadas con plásmidos que contenían un gen reportero (*gfp*), eran visualizadas en el equipo GE Typhoon FLA 9000 Gel Imaging Scanner para detectar fluorescencia.

2.3.3 Fusiones transcripcionales al gen reportero *gfp*

Las fusiones transcripcionales son frecuentemente utilizadas para facilitar los estudios de la expresión génica y el monitoreo de la actividad del promotor. El reportero se elige basándose en que el producto sea de fácil detección o permita un análisis cuantitativo. Esta estrategia permite evaluar la expresión bajo diferentes condiciones experimentales durante el progreso del cultivo celular. El gen reportero *gfp* presenta características importantes, destacando que para su detección no requiere ningún cofactor o sustrato para que la fluorescencia ocurra, como es el caso de otros genes (*lux* y *lacZ*) en donde son necesarios para que ocurra la reacción. Se han desarrollado varias mutantes de GFP que además han demostrado ser exitosamente expresadas en diversos organismos (eucariotas y procariontas) y que además puede usarse *in vivo* y de esta manera es posible estudiar cambios dinámicos en procesos biológicos. Finalmente, una clara ventaja es que GFP posee una relativa estabilidad en células vivas [114].

Para implementar esta estrategia la primera parte de la metodología consistió en clonar las regiones promotoras de los operones de interés (SmeABC y SmeYZ) en el plásmido pSEVA327 para generar las fusiones a *gfp*. Los plásmidos resultantes se usaron para transformar a Sm18.

En la segunda etapa se implementaron las cepas de Sm18 transformadas con los plásmidos p327ABC y p327YZ (Tabla 2.2) para infectar células del modelo *in vivo* propuesto (sección 2.4). Mediante microscopía de epifluorescencia, se observó si había expresión o no, de la proteína reportera GFP bajo los promotores de las bombas de interés (SmeABC y SmeYZ) durante la infección y replicación de Sm18 en trofozoitos de *A. castellanii*.

Evaluación de la participación de las bombas de eflujo en condiciones de estrés implicadas en la virulencia.

Se eligieron condiciones de cultivo a las que posiblemente se enfrentan fenotipos virulentos al invadir un hospedero y en las que pudieran estar participando las bombas de eflujo para ayudar a la bacteria a persistir bajo condiciones adversas, como la presencia de antibióticos y un pH ácido o alcalino, a distintas temperaturas (sección 3.1 y 3.2). Posteriormente, se cultivaron cepas que expresan *gfp* bajo los promotores de las bombas SmeABC y SmeYZ bajo estas condiciones y se evaluó la expresión del gen reportero. El cultivo se realizó en cajas Petri cuadradas inoculando 10-20 μL de cada cepa por triplicado (previamente se ajustó la DO=1 para cada cepa) y se dejaron incubando de 24-72h. Cada 24h se tomó una captura de la imagen de fluorescencia en un equipo GE Typhoon FLA 9000 Gel Imaging Scanner.

Análisis de imágenes con ImageJ Después de la captura con el equipo GE Typhoon FLA 9000 Gel Imaging Scanner, las imágenes se analizaron con el software ImageJ, primero se importaron los metadatos mediante el plugin *Bio-Formats Importer*. En seguida, se invirtió la imagen desde el menú *Edit*, se cambió el tipo de imagen a 16 bits y se seleccionó el *LUT green* (verde). Posteriormente, se realizó una medición del valor de gris promedio trazando un rectángulo en la zona de la caja donde no se encontrara ningún inóculo. Este valor de gris fue restado a toda la imagen mediante el comando *Math*(Subtrat) presente en el menú *Process*. A continuación, se realizó un análisis de frecuencias y se seleccionó la opción FFT (transformada de Fourier) para utilizar el *Bandpass filter*, esto únicamente permite que las frecuencias dentro de un rango específico de corte superior e inferior pasen los filtros. Es decir, las estructuras largas son filtradas hasta cierto número de píxeles (para este caso fueron 60 píxeles) y se filtraron estructuras pequeñas de hasta 1 píxel. Finalmente, se trazó un rectángulo que abarcara todos los inóculos presentes en el eje de las "x" y se obtuvo un histograma de valores de gris (ctrl+k) con respecto a la distancia, de esta manera se identificaron los picos de intensidad de fluorescencia de cada cepa y se obtuvieron los valores para realizar un análisis de densitometría que permitiera obtener valores de la expresión del reportero bajo diferentes condiciones de cultivo.

Densitometría Una vez que se obtuvieron los valores de cada pico de la intensidad de fluorescencia de cada cepa analizada, estos fueron procesados en R [115] para realizar gráficas de puntos (Dot-Plots) y también se realizó un análisis estadístico ANOVA unidireccional (One-way ANOVA). Sin embargo, ésta prueba no indica específicamente qué grupos son significativamente diferentes entre ellos, para eso debe realizarse una prueba Post hoc y en este caso se aplicó la de Tukey y se asignaron letras a cada valor representado en las gráficas (figuras 3.6, 3.7). El valor más alto recibe la letra "a". Las medias que son significativamente diferentes tienen letras distintas. Los resultados de las pruebas estadísticas se presentan en los Anexos.

2.3.4 Mutagénesis por integración de vector (vector integration mutagenesis, VIM)

Para la obtención de mutantes, se implementó una técnica de interrupción de genes causada por la inserción de un vector suicida en el cromosoma bacteriano. Este método consiste en construir un plásmido que contenga una región homóloga interna al gen a interrumpir, posteriormente, es usado para transformar o conjugar a la bacteria objetivo y a través de una recombinación homóloga sencilla el vector se introduce en el cromosoma originando una interrupción del gen de interés.

La etapa inicial comprendió la construcción de los vectores. Se clonaron las regiones homólogas (insertos) de cada uno de los genes que se deseaban interrumpir. Para esto, se cortó el vector pEX18Tc Δ sacB_gfp y el inserto con las enzimas de restricción correspondientes. Posteriormente, se procedió a unir al inserto con el plásmido y después se comprobó por medio de análisis fenotípico y por PCR, que efectivamente hubiera presencia de la región homóloga en el vector. Para la segunda etapa, los plásmidos construídos fueron movilizados por conjugación a la cepa de interés (Sm18) y se seleccionaron a las transconjugantes. Las colonias seleccionadas fueron sembradas y nuevamente se realizaron análisis fenotípicos para detectar a las posibles candidatas a mutantes. Finalmente, se prepararon gliceroles y se almacenaron para su posterior caracterización y comparación con la cepa silvestre bajo diferentes condiciones (resistencia a antibióticos y ensayos en modelos *in vivo*).

2.4 Ensayos en modelos *in vivo*

2.4.1 Ensayos de supervivencia intracelular en *A. castellanii*

Para evaluar la supervivencia de *S. maltophilia* Sm18 en la ameba *A. castellanii* se implementó una metodología basada en la técnica de co-cultivo [87] en un medio líquido no nutritivo PAS.

Cultivo y mantenimiento de amebas

La primera parte consistió en realizar un cultivo axénico de *A. castellanii* (Neff) a las condiciones descritas anteriormente (sección 2.1.1). A las 72h aproximadamente, se observó una monocapa de amebas distribuida por todo el fondo del frasco y una ligera turbidez en el medio de cultivo. Se procedió a tomar una alícuota para calcular la concentración por conteo en cámara de Neubauer. Después, las células se cosecharon agitando vigorosamente el frasco y recuperando la suspensión celular. El cultivo se centrifugó a 1500g por 10 min y posteriormente se realizaron dos lavados con medio PAS y al final se resuspendió nuevamente en este medio. En seguida, nuevamente se realizó un conteo celular y se ajustó el cultivo a la concentración deseada (Ej: 5×10^5 células/mL). El siguiente paso consistió en inocular 1mL/pozo en cada una de las placas a utilizar y después

se centrifugaron para lograr la sedimentación de las amebas. Finalmente, se incubó la placa por 1-2 h a 30 °C para asegurar su adhesión al fondo de cada pozo.

Técnica de co-cultivo

La segunda etapa se realizó inoculando cada pozo con una concentración definida de la cepa de interés (Sm18 o Sm18 transformada con pSEVA327) para obtener la multiplicidad de infección (MOI) deseada. Las bacterias también fueron lavadas y resuspendidas en medio PAS antes de ser inoculadas. La placa se centrifugó a 1800g por 10 min para procurar un contacto inmediato entre las amebas depositadas en el fondo y las bacterias. Se incubó la placa por 45 min a 30 °C y posteriormente, se hicieron tres lavados con medio PAS y al finalizar se añadió medio fresco (PAS). Finalmente, se incubó la placa a 30 °C y se realizó un monitoreo a diferentes tiempos de cultivo con un microscopio de epifluorescencia AxioVert A1 de ZEISS, la captura de imágenes se realizó con el objetivo LD 63X Ph2 de apertura numérica (NA) de 0.75.

Análisis de la interacción bacteria-hospedero *in vivo* por medio de microscopía de epifluorescencia.

Con la finalidad de observar la interacción entre Sm18 y *A. castellanii* en los ensayos de co-cultivo, se utilizó un microscopio AxioVert de ZEISS con el objetivo 63X para capturar imágenes a diferentes tiempos de cultivo y diferentes MOIs. Como resultado de este análisis, se obtuvieron imágenes de contraste de interferencia diferencial (plas-DIC) y de epifluorescencia para cada una de las condiciones empleadas en los experimentos.

Capítulo 3

Resultados

Obtención de cepas de *S. maltophilia* que expresan GFP bajo las regiones promotoras de las bombas SmeABC y SmeYZ.

Las fusiones transcripcionales se obtuvieron mediante la construcción de vectores derivados del pSEVA327 (tabla 2.2). Este plásmido posee al gen *gfp* con una secuencia Shine-Delgarno fuerte y está diseñado para insertar río arriba a un promotor, que en este caso consistió en la región promotora de los genes que conforman a la bomba SmeABC (figura 3.1) o SmeYZ (figura 3.2) con técnicas de biología molecular (PCR, digestión y ligación) (figura 3.3, a). Entre los genes colindantes, se encuentran sistemas de dos componentes (TCS) que se transcriben de manera divergente a las bombas.

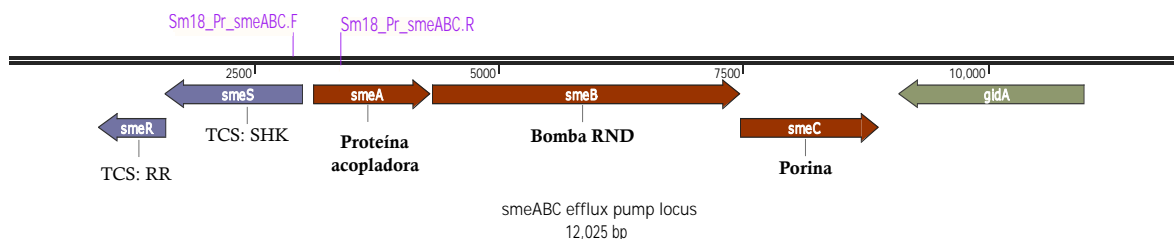


Figura 3.1: Mapa genético del operón SmeABC y sus genes colindantes en *S. maltophilia* Sm18. En morado se indica el sitio de unión de los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región promotora. TCS, sistema de dos componentes, SHK: sensor histidina cinasa, RR: regulador de respuesta.

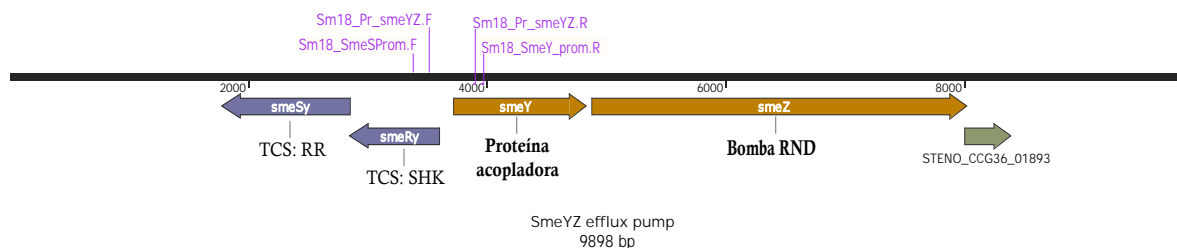


Figura 3.2: Mapa genético del operón SmeYZ y sus genes colindantes en *S. maltophilia* Sm18. En morado se indica el sitio de unión de los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región promotora. Región promotora YZ: se usó el par Sm18_Pr_smeYZ.F y Sm18_Pr_smeYZ.R. Región promotora YZe (extendida): se usó el par Sm18_SmeSProm.F y Sm18_SmeY_prom.R. TCS, sistema de dos componentes, SHK: sensor histidina cinasa, RR: regulador de respuesta.

Con la reacción de ligación (pSEVA327+región promotora) se transformaron células quimicompetentes de *E. coli* DH5 α y se seleccionaron colonias basándose en la resistencia a antibiótico y se evaluó la presencia del inserto mediante PCR de colonia. Se extrajo ADN plasmídico (ADNp) de aquellas que poseían el inserto y después se validó la presencia de éste, mediante PCR usando el ADNp como templado. Posteriormente, se electroporó a *S. maltophilia* Sm18. Se seleccionaron transformantes de Sm18 y se extrajo ADNp para confirmar que los tamaños de los plásmidos correspondieran a lo esperado: p327ABC, fusión de la región promotora de los genes *smeABC* (4881 pb); p327YZ, fusión de la región promotora de los genes *smeYZ* (4773 pb); p327YZe, fusión de una región promotora más amplia que en el vector p327YZ (4955 pb) (figura 3.3).

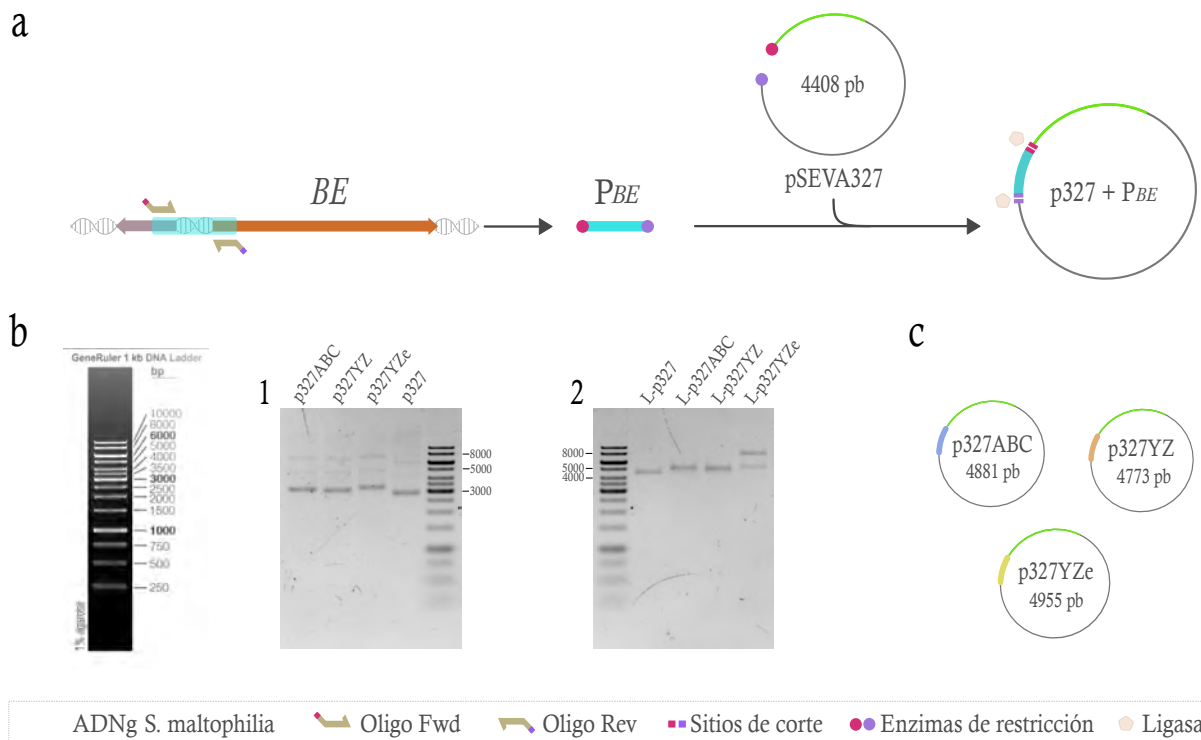


Figura 3.3: Estrategia de obtención de transformantes de Sm18 que portan fusiones transcripcionales a *gfp*. **a**) Se amplificó la región promotora de los genes que codifican la BE (P_{BE} , inserto) por PCR y después fue digerida al igual que el vector pSEVA327 con enzimas de restricción. Posteriormente, la región P_{BE} se subclonó en el vector pSEVA327 y se procedió a transformar células de *E. coli* DH5 α para amplificar el plásmido, se confirmó la presencia del inserto (mediante PCR y digestiones del ADNp) y se transformó a Sm18. **b**) Se seleccionaron transformantes de Sm18 de las cuales se extrajeron plásmidos para analizarlos respecto a su perfil de migración en gel de agarosa (**1**) y digestiones (**2**) para verificar su correcta construcción. **c**) Vectores contruidos que portan fusiones al gen reportero. BE, operon de la bomba de eflujo; P_{BE} , región promotora de los genes de la BE; inserto (ABC, YZ, YZe); L-p327, vectores linealizados con enzimas de restricción. Información de los plásmidos en la tabla 2.2.

El perfil de plásmidos mostró diferencias en la migración de sus isoformas al compararlos con el vector vacío (p327, 4408 pb) y al ser linealizados los tamaños correspondieron al esperado.

Las dos bandas observadas en el carril del vector L-p327YZe puede deberse a una digestión incompleta, ya que una banda tuvo el tamaño adecuado (4955 pb) pero la otra se asemeja a una isoforma no digerida (≈ 8000 pb) (figura 3.3, b). Sin embargo, se detectó la expresión de GFP bajo el promotor de SmeYZ (figura 3.4).

Esta metodología permitió obtener cepas transformantes portadoras de cada uno de los tres vectores generados (figura 3.3, c).

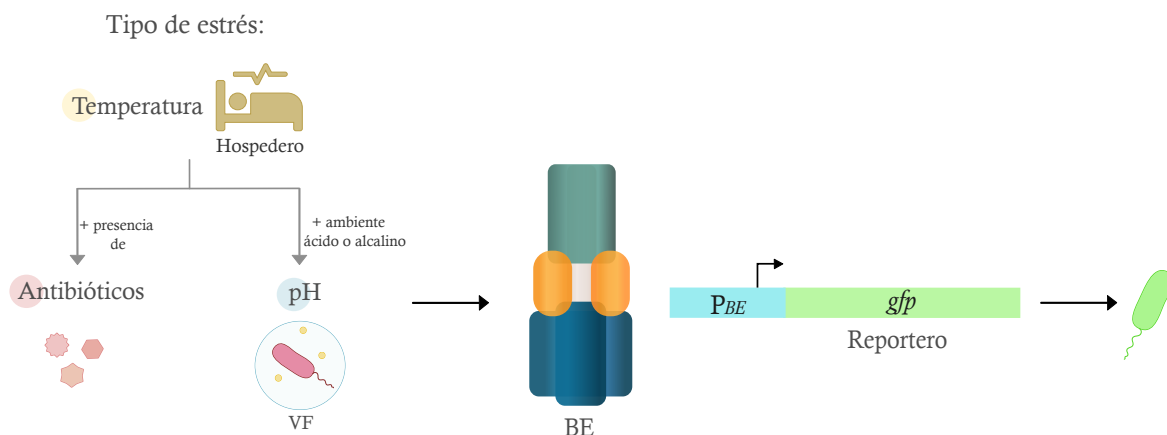
Evaluación de la expresión de SmeABC y SmeYZ bajo condiciones de estrés que pudiera experimentar Sm18 en su hospedero.

La participación de las BsE se evaluó bajo condiciones de estrés, como la presencia de antibióticos y aquellas que simularan el ambiente al que se enfrentan las bacterias al invadir a un hospedero, como un pH ácido (pH 5-5.5), neutro o alcalino (pH 8.5-9). Los ambientes ácidos se presentan dentro de vesículas o células fagocíticas y los alcalinos en los tractos intestinales de animales, ambos representan entornos en los cuales se ha identificado la presencia de *S. maltophilia* [15, 16, 116, 17, 18, 19, 25].

Se eligieron dos temperaturas, la que se utiliza para el crecimiento normal de la cepa (30 °C) y una que asemeje a un hospedero humano (37 °C). También se usaron antibióticos debido a la contribución de estos sistemas en la resistencia, como β -lactámicos (IM, imipenem), aminoglucósidos (Km, kanamicina) y tetraciclina (Tc), así como diferentes valores de pH (figura 3.4, a).

La evaluación de la participación de SmeABC y SmeYZ se realizó midiendo la intensidad de fluorescencia de las cepas que expresan GFP bajo sus promotores. Para discriminar los niveles de autofluorescencia, se incluyó una cepa silvestre (WT) y una cepa silvestre transformada con el plásmido pSEVA327 vacío, *gfp* sin promotor (Sm18/pSEVA327). Todas las cepas fueron cultivadas de manera simultánea y se realizó la captura de imágenes a diferentes tiempos de cultivo (figura 3.5). Posteriormente se analizaron las imágenes y mediante densitometría se comparó la intensidad de fluorescencia de cada cepa (figura 3.4, b).

a. Estrategia



b. Densitometría

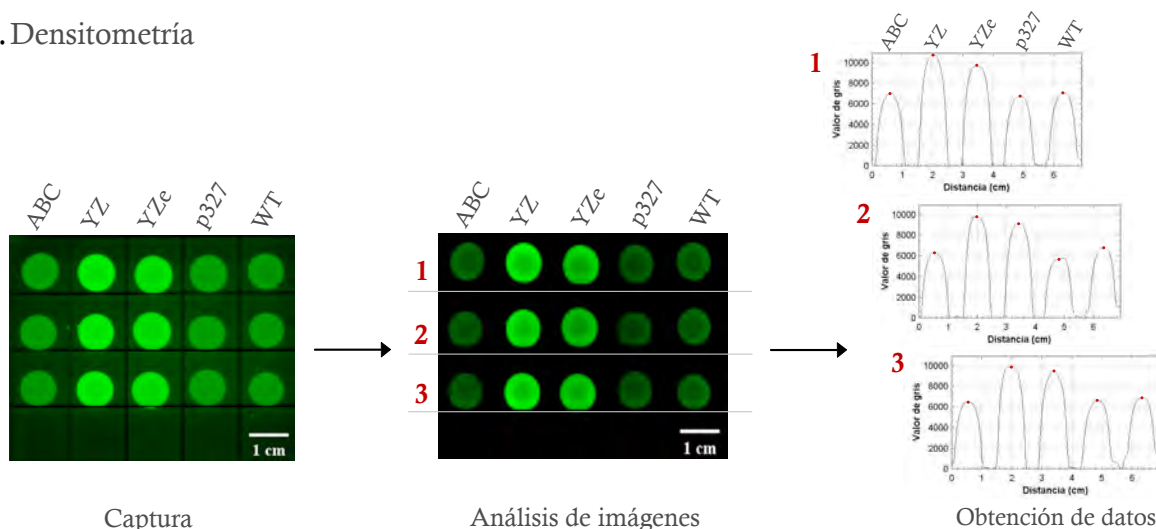


Figura 3.4: Evaluación de la participación de las bombas de eflujo en condiciones de estrés implicadas en la virulencia. a) Condiciones a las que la bacteria se enfrenta durante la invasión y en las que las bombas podrían contribuir a la persistencia en ambientes adversos, como la temperatura del hospedero además del pH ácido de vesículas fagocíticas (VF) o la presencia de antibióticos. Se usó un gen reportero (*gfp*) río abajo de los promotores de los genes de las bombas (P_{BE}), para obtener células de Sm18 que expresen la proteína fluorescente cuando los operones de las bombas se transcriban. b) Densitometría para evaluar la expresión del reportero en respuesta a la temperatura en presencia de antibióticos o frente a diferentes pHs del medio. Para la obtención de datos de intensidad de fluorescencia se obtuvieron perfiles de valores de gris en ImageJ en donde los numeros en rojo (1,2,3) corresponden a las réplicas técnicas. ABC, Cepa sm18/p327ABC; YZ, Cepa sm18/p327YZ; YZe, Cepa sm18/p327YZe; p327, Cepa sm18/pSEVA327 (*gfp* sin promotor); WT, Cepa Sm18.

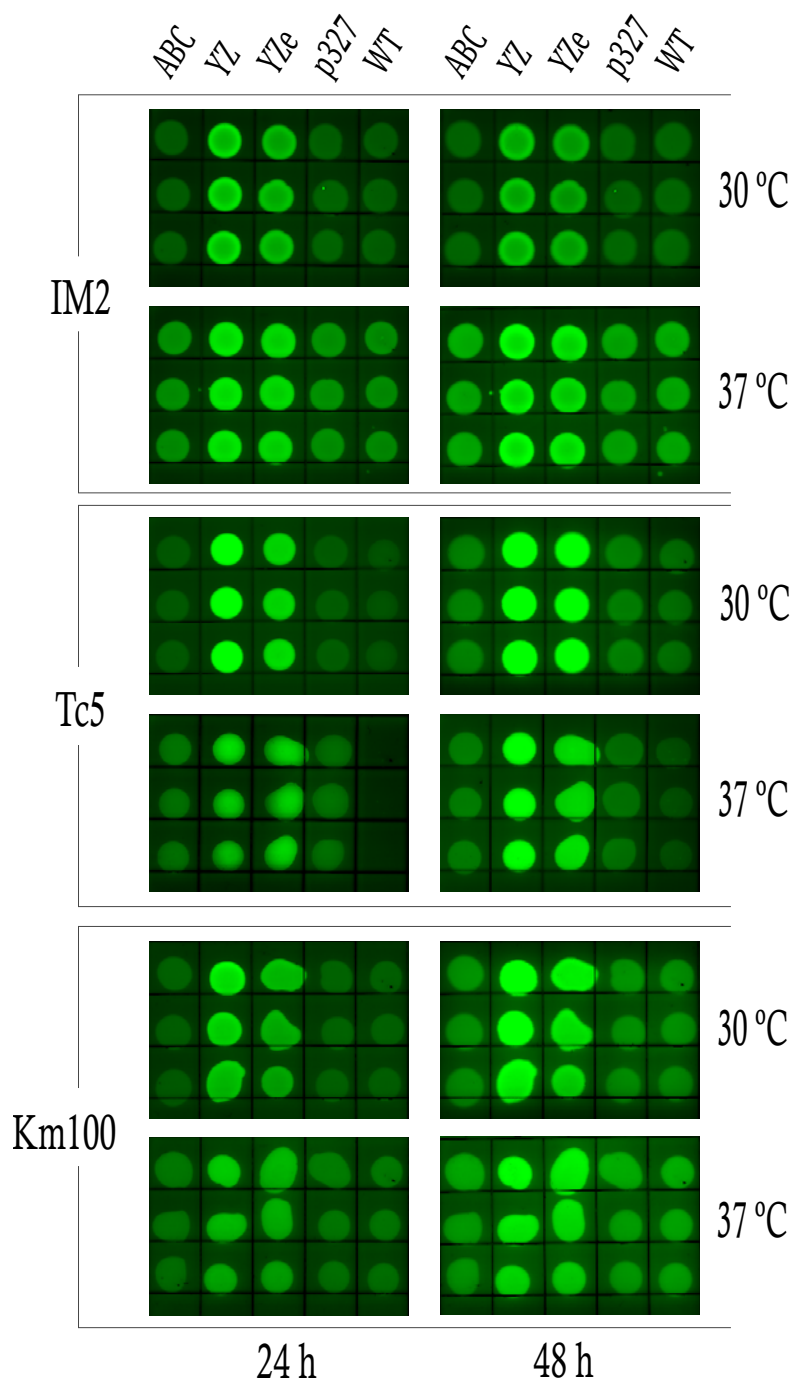


Figura 3.5: Ensayo para evaluar la expresión de bombas de eflujo bajo diferentes condiciones de cultivo. Imágenes obtenidas en el equipo Typhoon (sección 2.3.3) para detectar la expresión de las BsE mediante fusiones transcripcionales al reportero GFP. IM2, imipenem 2 ug/mL; Tc5, tetraciclina 5 ug/mL, Km100, kanamicina 100 ug/mL. ABC, Cepa sm18/p327ABC; YZ, Cepa sm18/p327YZ; YZe, Cepa sm18/p327YZe; p327, Cepa Sm18/pSEVA327 (*gfp* sin promotor); WT, Cepa Sm18.

3.1 Las bombas de eflujo SmeABC y SmeYZ se expresan de manera diferencial con respecto a las condiciones de cultivo.

La expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de antibióticos en el medio se presenta en la figura 3.6 y se describe a continuación:

SmeABC: no se expresa en presencia de imipenem o kanamicina, únicamente se detectó su expresión en presencia de tetraciclina a las 48h, a 37 °C (Tc5, figura 3.6).

SmeYZ: se expresa en presencia de todos los antibióticos probados y en el control sin antibióticos (NA, figura 3.6) . Se detectó una mayor expresión en presencia de imipenem, tetraciclina y kanamicina a 30 °C con respecto al control sin antibióticos (NA, figura 3.6). En presencia de tetraciclina, la expresión de SmeYZ a las primeras 24h fue menor a 37 °C con respecto al cultivo a 30 °C. Se ha observado que la cepa Sm18 es incapaz de crecer a una concentración superior a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina por lo que este fenómeno podría atribuirse a un impacto metabólico en respuesta al estrés de la temperatura aunado a la presencia del antibiótico durante el inicio del cultivo. A tiempos posteriores, se expresó igual a ambas temperaturas, figura 3.6.

SmeYZe: se expresa en presencia de todos los antibióticos probados:

1. Imipenem: su expresión fue menor que SmeYZ a ambas temperaturas.
2. Tetraciclina: su expresión fue menor que SmeYZ a 30 °C. A una mayor temperatura (37 °C) se expresaron igual a las 24h y posteriormente los resultados indican una mayor expresión de SmeYZ.
3. Kanamicina: a las primeras 24h a 30 °C se expresó menos que SmeYZ y posteriormente los valores se igualaron (48h). A 37 °C se expresó igual que SmeYZ.

La participación de las bombas de eflujo en respuesta al pH del medio se presenta en la figura 3.7 y se describen a continuación:

1. No se detectó expresión de SmeABC.
2. SmeYZ se expresó a todos los pHs del medio probados.
3. SmeYZe también se expresa a todos los pHs evaluados. Comparándola con SmeYZ, en un pH ácido (pH5, figura 3.7) se expresaron igual a 30 °C. A una mayor temperatura, se expresaron igual. En un medio con pH neutro, se expresaron igual a ambas temperaturas (pH7). La expresión de SmeYZe en un medio alcalino fue menor que SmeYZ a 30 °C, mientras que a 37 °C, se expresaron igual (pH9, figura 3.7).

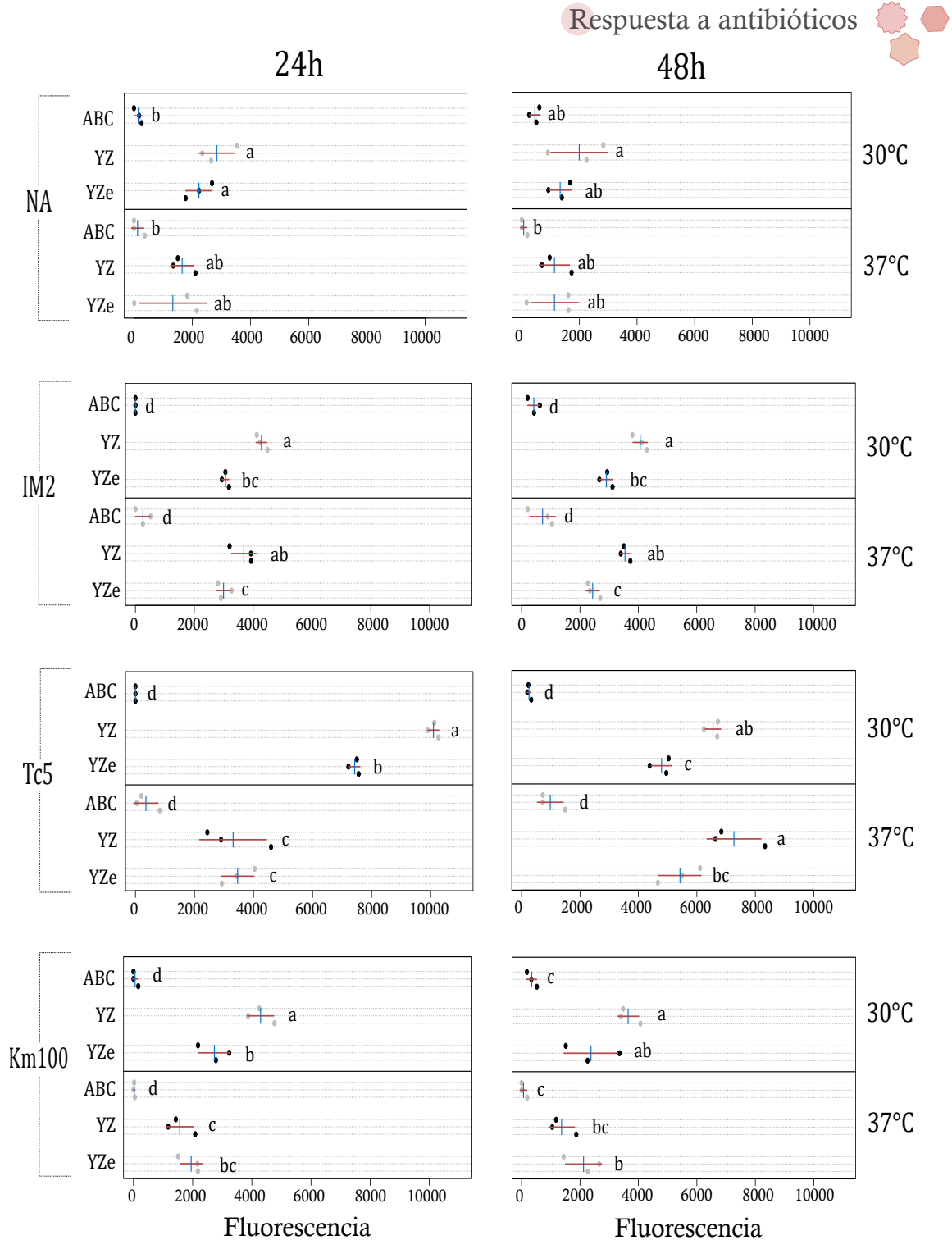


Figura 3.6: Expresión de SmeABC y SmeYZ en respuesta a antibióticos, se evaluó la expresión en cada cepa a tres tiempos de cultivo y a diferente temperatura. ABC, YZ y YZe: cepas de Sm18 que expresan *gfp* bajo los promotores de SmeABC y SmeYZ. Valores normalizados con el control (sm18/p327, *gfp* sin promotor). NA, sin antibiótico; IM2, Imipenem 2 μ g/mL; Tc5, tetraciclina 5 μ g/mL; Km100, kanamicina 100 μ g/mL. Líneas azules: promedio de los tres valores obtenidos correspondientes a las réplicas técnicas. Líneas rojas: desviación estándar. a, b, c, d: prueba Tukey, valores que son significativamente diferentes tienen letras distintas.

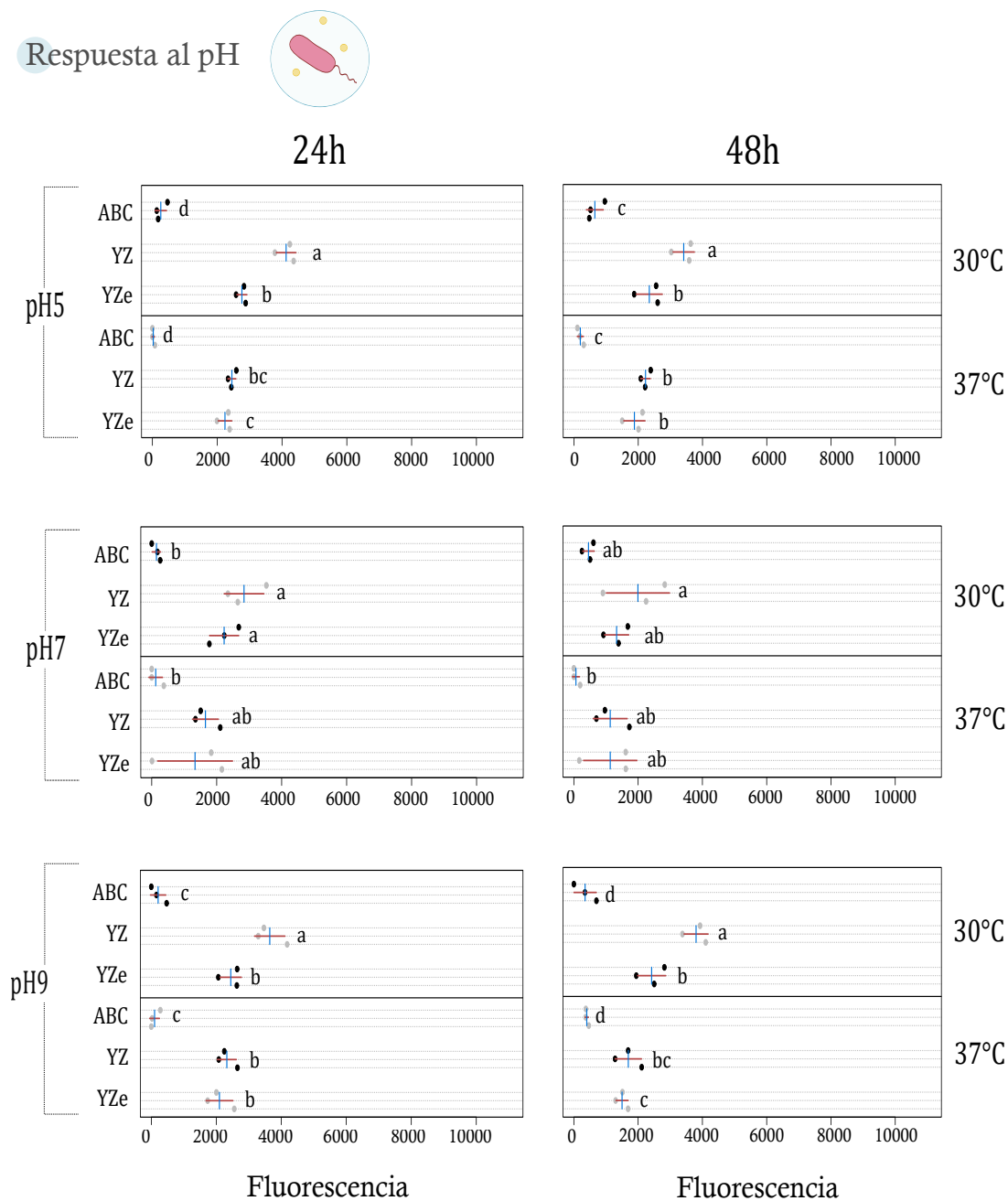


Figura 3.7: Expresión de las bombas de eflujo SmeABC y SmeYZ en respuesta al pH del medio. Se evaluó la expresión de las bombas en cada cepa a diferentes tiempos de cultivo y distinta temperatura. ABC, YZ y YZe corresponden a cepas de Sm18 que expresan *gfp* bajo los promotores de SmeABC y SmeYZ. Los valores fueron normalizados tomando en cuenta el control (Sm18/p327, *gfp* sin promotor). Las líneas azules representan el promedio de los tres valores obtenidos correspondientes a las réplicas técnicas y las líneas rojas representan la desviación estándar. a, b, c, d: prueba Tukey, valores que son significativamente diferentes tienen letras distintas.

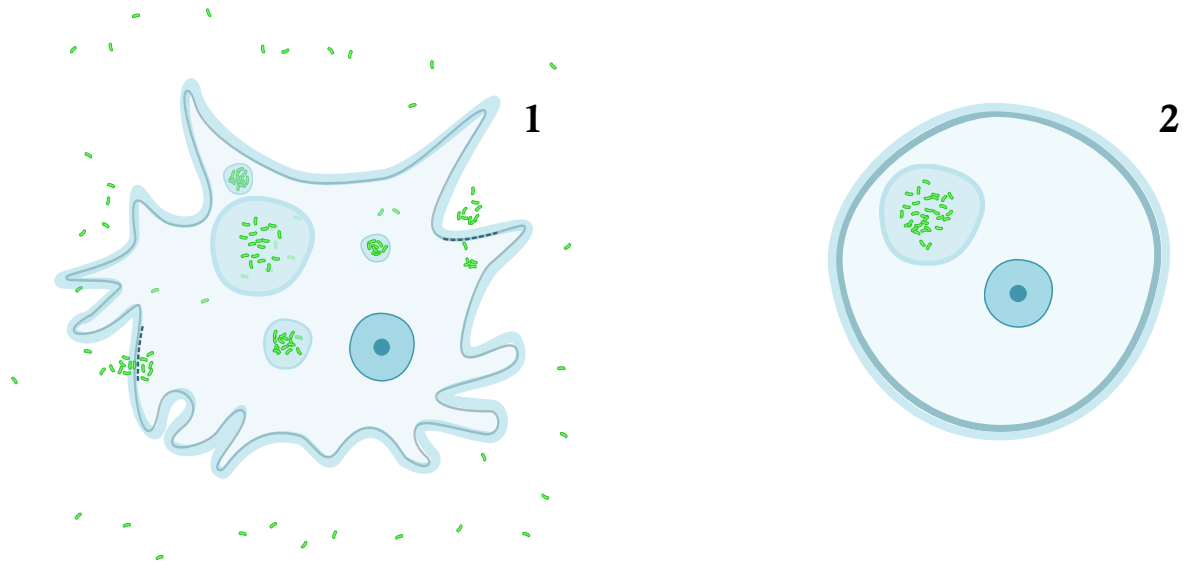
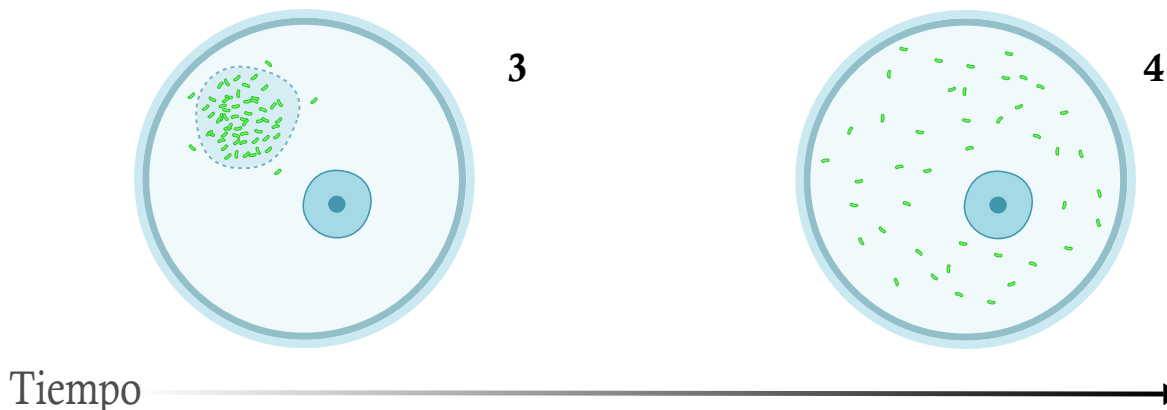
3.2 Visualización de la interacción *in vivo* entre *S. maltophilia* y *A. castellanii*

El papel de las bombas de eflujo en *S. maltophilia* ha sido principalmente caracterizado en fenotipos de resistencia, sin embargo, su participación en la virulencia no ha sido del todo explorada. En este sentido, resulta esencial evaluar las bombas de *S. maltophilia* en este aspecto, para lo cual se implementó un modelo *in vivo*, una ameba de vida libre que permitiera empezar a entender la interacción de esta especie con el hospedero mediante un enfoque basado en bioimagenología.

Durante los primeros ensayos de co-cultivo se empleó una cepa de Sm18 transformada con un plásmido que expresa GFP bajo un promotor constitutivo. La finalidad era observar evidencias de la capacidad de la bacteria para persistir a la digestión, lo que resultaría en una señal de fluorescencia al interior de la ameba e incluso permanencia de las bacterias aún después de la transición del estado de trofozoito (cuando la ameba depreda) al quiste (figura 3.8, a). Otro fenómeno posible era la replicación, resultando en un incremento de la señal de fluorescencia asociado a un mayor número de bacterias intracelulares, lo que podría llegar a ocasionar la lisis de la ameba (figura 3.8, b). Se implementaron dos multiplicidades de infección (MOI= 20:1 o 50:1) con la finalidad de poder determinar la relación adecuada entre el número de bacterias y amebas que propicie su interacción.

La figura 3.9 corresponde a un ensayo realizado a una multiplicidad de infección (MOI) de 20:1 y se monitoreó a diferentes tiempos de co-cultivo: desde tiempos tempranos (1 hora post-inoculación, hpi) para evaluar la interacción con la ameba en su estado de trofozoito, donde es metabólicamente activa, hasta tiempos tardíos cuando se encuentra enquistada. Durante la primera hora se observó la presencia de bacterias en el medio y la depredación por parte de las amebas (figura 3.9, 1 hpi).

A las 24 hpi se detectaron bacterias en algunas porciones de amebas enquistadas, uno de estos casos se presenta en la figura 3.9. En todos los quistes observados, estas regiones están próximas a un extremo. Estos eventos sugieren la persistencia bacteriana intracelular, ya que las bacterias debieron ser depredadas al inicio del ensayo por los trofozoitos y sobrevivir al proceso de enquistamiento.

a. Persistencia**b.** Replicación

Tiempo →

Figura 3.8: Esquema de la interacción *in vivo* entre *S. maltophilia* y *A. castellanii* Neff. Posibles escenarios presentes durante ensayos de co-cultivo en medio PAS (Page's amoeba saline medium), en donde *S. maltophilia* expresa constitutivamente a la proteína reportera GFP. a) Fenómeno de persistencia (escenario 1 y 2): *S. maltophilia* es capaz de persistir la depredación por la ameba y al no poder ser digerida es liberada al medio o permanece dentro de vesículas (escenario 1), posteriormente es capaz de permanecer intracelularmente durante el cambio de estado de la ameba de trofozoito a quiste, donde permanece protegida frente a condiciones adversas (escenario 2). b) Fenómeno de replicación (escenario 3 y 4): al poder persistir durante el enquistamiento, la bacteria utiliza a la ameba como un nicho replicativo y comienza a reproducirse dentro hasta terminar lisando la vacuola que la contiene y liberándose hacia el citosol (escenario 3). Finalmente podría lisar al hospedero tal como se ha reportado para otros patógenos (escenario 4).

Persistencia

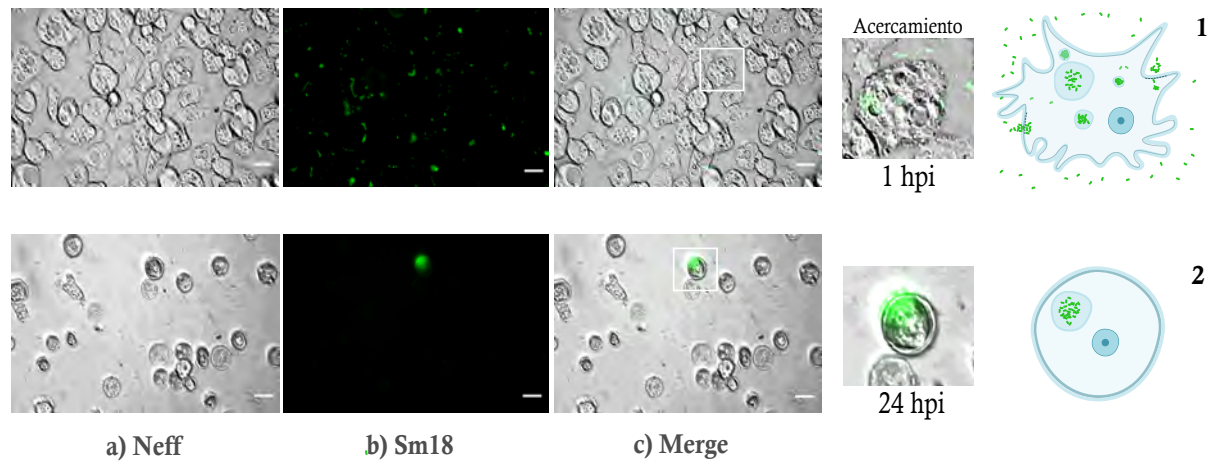


Figura 3.9: Evaluación de la persistencia de *S. maltophilia* mediante epifluorescencia a diferentes horas post-inoculación (hpi) en ensayos de co-cultivo entre *A. castellanii* y Sm18. a) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) donde se observan las amebas, b) Imagen de fluorescencia para identificar a la cepa mediante la detección del reportero GFP. c) Unión de canales: DIC+fluorescencia. Ensayo realizado a una MOI de 20:1, a tiempos tempranos (1 hpi) se observan bacterias en el medio y comienza la depredación por parte de las amebas. A tiempos posteriores (24 hpi) se observan amebas en estado de quistes con regiones fluorescentes que podrían corresponder a bacterias persistiendo intracelularmente (figura 3.5, escenario 1 y 2). Barra de escala: 20 μm .

A tiempos tardíos de co-cultivo (figura 3.10, 48 hpi y 96 hpi) se observaron bacterias distribuidas en toda la extensión del quiste, sin embargo, este fenómeno no se repitió en todas las amebas cultivadas. Estos eventos podrían ser resultado de una replicación bacteriana intracelular. El ensayo también se realizó usando una cepa de *E. coli* DH5 α y en este caso no se observó éste fenómeno (Anexo B, figura B.2 y B.3, 72 hpi y 96 hpi).

Replicación

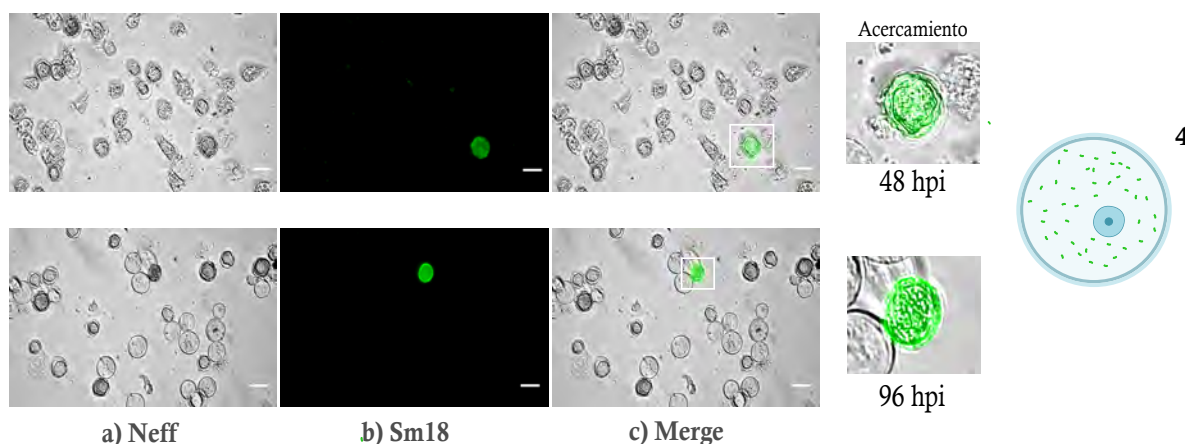


Figura 3.10: Evaluación de la replicación de *S. maltophilia* mediante epifluorescencia a diferentes tiempos post-inoculación (hpi) en ensayos de co-cultivo entre *A. castellanii* y Sm18. a) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) donde se observan las amebas, b) Imagen de fluorescencia para identificar a la cepa mediante la detección del reportero GFP. c) Unión de canales: DIC+fluorescencia. A tiempos tardíos y usando dos MOI's distintas, de 50:1 (48 hpi) y de 20:1 (96 hpi) se identificaron quistes fluorescenciando lo que podría indicar una invasión y replicación de Sm18 dentro del hospedero (figura 3.5, escenario 4). Barra de escala: 20 μm .

3.3 Evaluación de la participación de SmeABC y SmeYZ en la persistencia y replicación de *S. maltophilia* en *A. castellanii*.

Los ensayos de co-cultivo también se implementaron para evaluar la expresión de las bombas de eflujo en la invasión del hospedero. La finalidad era detectar la expresión del reportero una vez que las bacterias fueran depredadas por la ameba, como parte de los mecanismos que implementa *S. maltophilia* para persistir la digestión (figura 3.11).

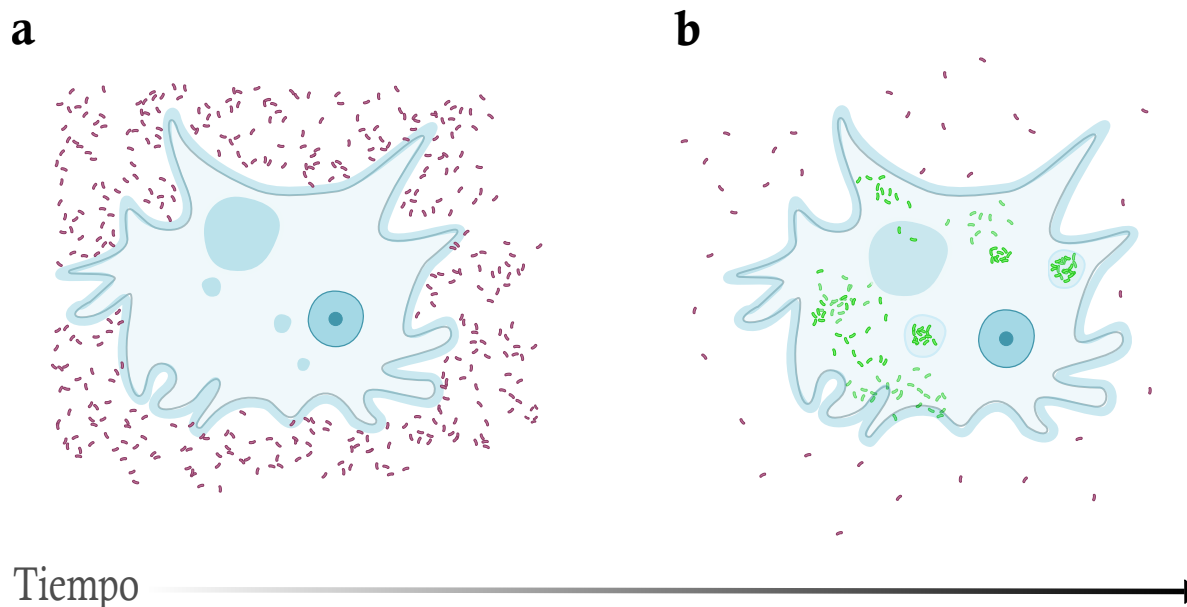


Figura 3.11: Esquema de la contribución de las bombas SmeABC y SmeYZ de *S. maltophilia* en la invasión de un nicho intracelular eucariótico (*A. castellanii*). Posibles escenarios de interacción entre cepas de *S. maltophilia* expresando *gfp* bajo regiones promotoras de las bombas y células de *A. castellanii*. a) Las bacterias se encuentran únicamente en el medio de cultivo y no han interactuado con la ameba. b) Comienza la depredación por parte de las amebas, las bacterias son internalizadas en vacuolas digestivas y se activan mecanismos que le permitan persistir la digestión y replicar en un nicho intracelular. Se espera que las bombas de eflujo participen en este proceso lo que resultaría en la expresión del reportero *gfp*.

En el ensayo donde se usó una MOI= 20:1, a tiempos iniciales de co-cultivo (1 hpi) no se detectó expresión de SmeABC de las bacterias presentes en el medio (figura 3.12). Sin embargo, durante el ensayo con una MOI= 50:1 a las 24 hpi se detectó un quiste fluoresciendo, un fenómeno que solo volvió a observarse a tiempos tardíos (72 hpi y 96 hpi) con la MOI= 20:1, donde se observaron bacterias internalizadas. Esto podría ser indicio de la replicación intracelular en donde la participación de la bomba podría ser necesaria como parte de los mecanismos de supervivencia. Sin embargo, como en los casos anteriores este evento no se observó para los demás quistes (figura 3.12).

Neff/Sm18::p327ABC

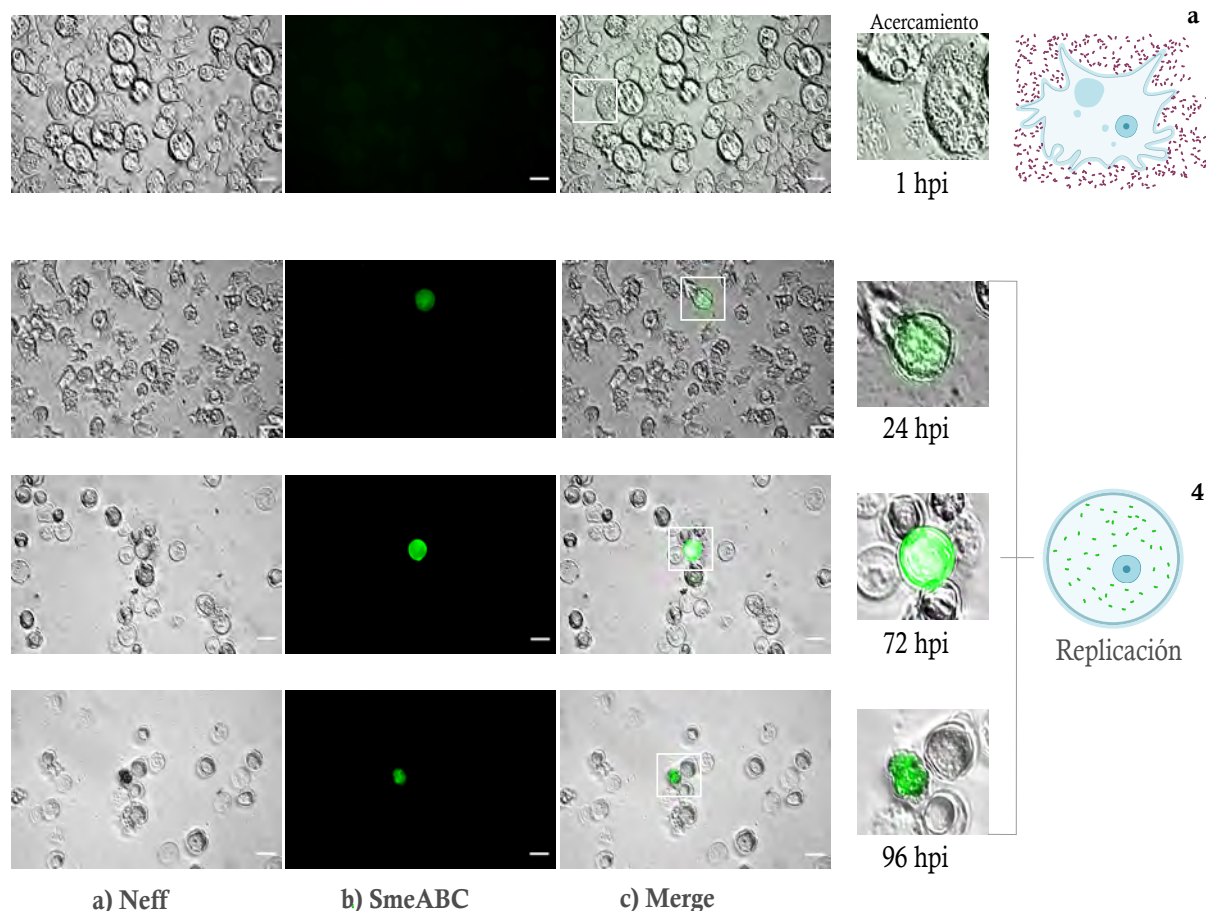


Figura 3.12: Evaluación de la expresión de bombas de eflujo mediante epifluorescencia durante la interacción de Sm18/p327ABC con *A. castellanii*. a) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) donde se observan las amebas, b) Imagen de fluorescencia para identificar a la cepa mediante la expresión del reportero. c) Unión de canales: DIC+fluorescencia. Ensayo de co-cultivo usando una MOI= 20:1. A tiempos tempranos (1 hpi) no se observó señal de fluorescencia indicando que no se está realizando la transcripción de la bomba SmeABC en estas condiciones (figura 3.8, escenario a). Sin embargo, a las 24 hpi con una MOI= 50:1, se observó un quiste fluoresciendo. Un fenómeno similar fue detectado en el ensayo con una MOI= 20:1 pero a tiempos tardíos de co-cultivo (72 hpi y 96 hpi) esto podría atribuirse a la replicación intracelular de la bacteria (figura 3.5, escenario 4). Barra de escala: 20 μm .

La expresión de SmeYZ se observó desde la primera hora de co-cultivo cuando las bacterias estaban en el medio, antes de interactuar con la ameba. A tiempos posteriores (4 hpi) se observó una porción de un quiste con bacterias internalizadas (figura 3.13). A tiempos tardíos (72 hpi), se identificó un quiste con bacterias distribuidas en todo el interior posiblemente como consecuencia de la replicación intracelular (figura 3.13). Nuevamente, el número de quistes experimentando este fenómeno fue escaso. Como ya se

había observado anteriormente, esta bomba se expresa durante el cultivo de Sm18 bajo diferentes condiciones, sin embargo, es importante determinar si realmente representa un papel en los mecanismos de supervivencia intracelular en el hospedero.

Durante los ensayos también se incluyó una cepa de *E. coli* DH5 α , con esta cepa no se observaron "quistes fluorescentes" en ninguna de las dos MOIs utilizadas (Anexo B, figuras B.2, B.3, y B.5).

Neff/Sm18::p327YZ

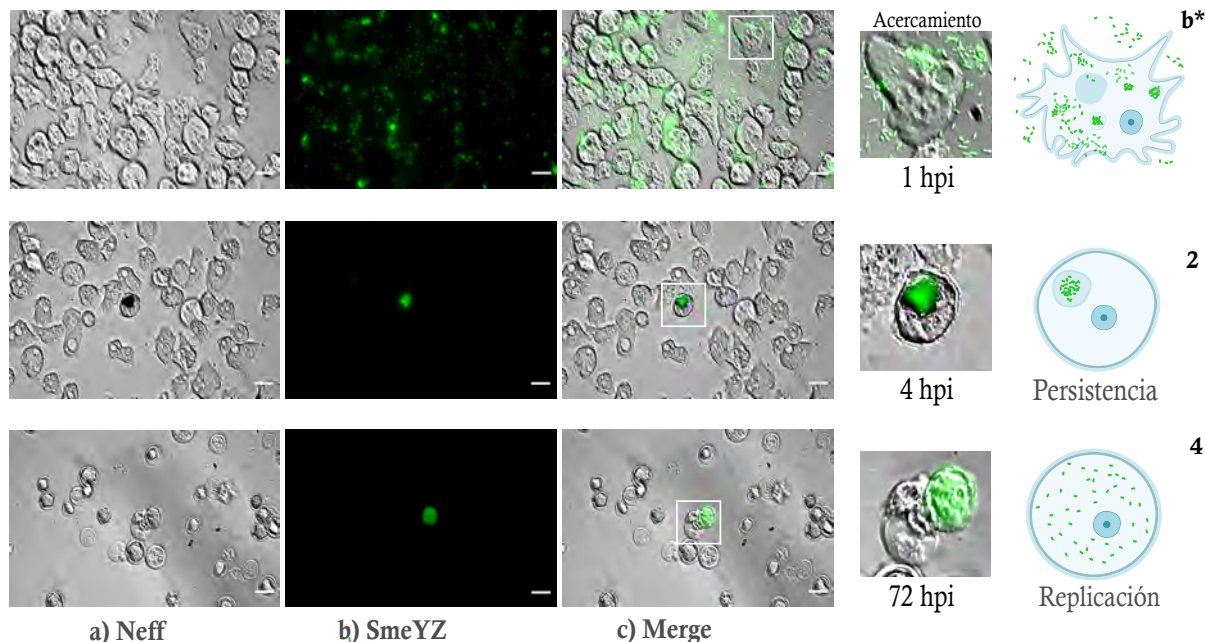


Figura 3.13: Evaluación de la expresión de bombas de eflujo mediante epifluorescencia durante la interacción de Sm18/p327YZ con *A. castellanii*. En un ensayo de co-cultivo con una MOI=20:1 se observó desde tiempos tempranos (1 hpi) la fluorescencia de la cepa, incluso antes de la depredación por la ameba (b*) y a las 4 hpi, un posible evento de persistencia (figura 3.5, 2). Con respecto al ensayo con una MOI=50:1, a las 72 hpi se observó un escenario de replicación intracelular (figura 3.5, 4). Barra de escala: 20 μ m.

Obtención de mutantes de bombas de eflujo mediante interrupción de genes por integración de un vector, VIM.

Se realizó la construcción del vector necesario para implementar la estrategia de obtención de mutantes mediante la estrategia VIM (vector integration mutagenesis) (sección 2.3.4). De esta manera se obtuvo el plásmido p512S_smeZ (figura 3.14, a). Posteriormente fue amplificado en células *E. coli* DH5 α λ pir debido a que este vector solo puede ser replicado en células que expresen la proteína pir. Finalmente, se extrajo ADN plasmídico de las transformantes y se verificó la correcta construcción del plásmido mediante PCR (C1,

C2 smeZ) (figura 3.14, c).

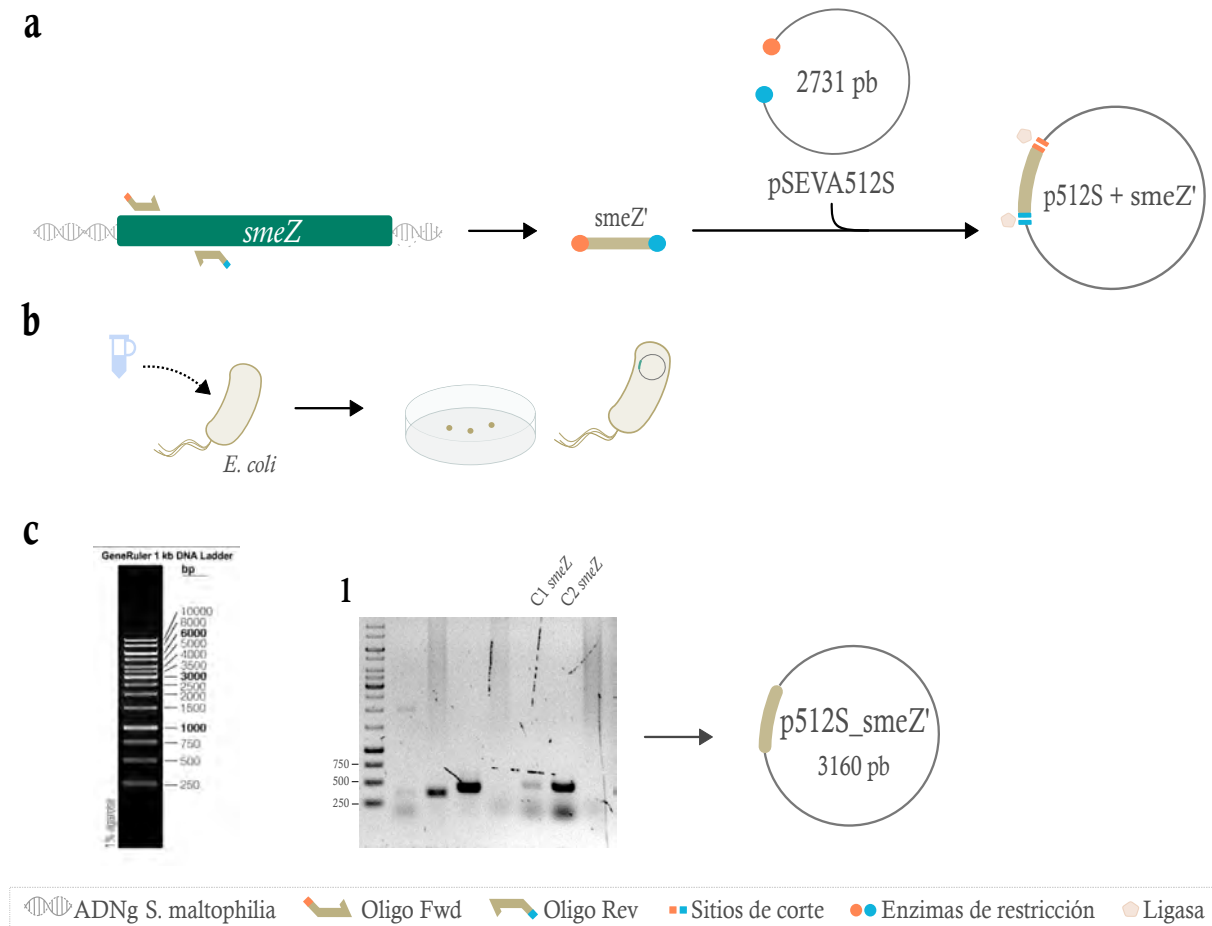


Figura 3.14: Generación de plásmidos para la estrategia de mutagénesis por integración de vector. a) Diagrama del proceso de construcción de plásmidos para la estrategia de VIM. Se amplificó por PCR la región interna (inserto) al gen a interrumpir (*smeZ*) y posteriormente tanto el vector como el inserto fueron digeridos con enzimas de restricción. Se procedió a clonar el inserto en el vector y posteriormente, este plásmido se transformó en *E. coli*. Se seleccionaron transformantes y se extrajeron los plásmidos construidos. b) Geles de agarosa producto de la técnica de electroforesis para analizar los plásmidos obtenidos. 1) PCR usando como templado los plásmidos extraídos de dos colonias seleccionadas para confirmar la correcta construcción del vector (p512S_smeZ') mediante la identificación del inserto (smeZ'). El plásmido construido confiere resistencia a tetraciclina (TcR), la cual se usó como marcador de selección (p512S_smeZ). C, colonia.

Una vez que se confirmó la construcción del vector se procedió a movilizarlo a la cepa Sm18 (figura 3.15, a). Este es un vector suicida y no es replicativo en Sm18, únicamente mediante el reconocimiento de la región homóloga al gen presente en el cromosoma bacteriano se produciría una recombinación homóloga resultando en su integración al cromosoma,

interrumpiendo el gen diana (figura 3.15, b). Para comprobar el evento de integración, se seleccionaron colonias en un medio con tetraciclina a una concentración superior a la tolerada por la cepa silvestre, debido a que el plásmido confiere resistencia a este antibiótico (TcR) (figura 3.15, c).

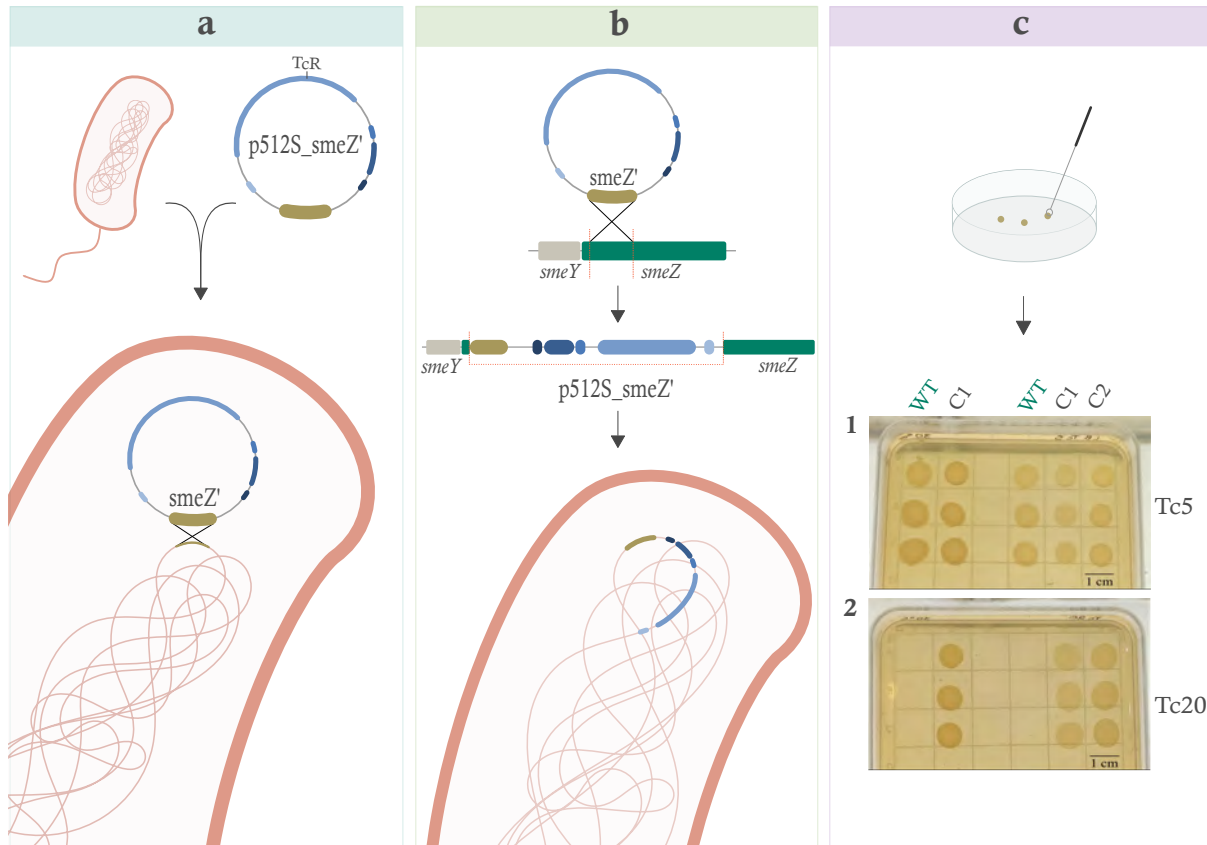


Figura 3.15: Obtención de mutantes mediante estrategia de interrupción de genes por integración de un vector. a) Diagrama de la transformación de la cepa silvestre Sm18 con el vector p512S_smeZ. b) El plásmido se integra vía recombinación sencilla en el sitio de homología del gen a interrumpir. c) Se procedió a seleccionar las recombinantes sencillas en medio adicionado con Tc20, debido a que el vector confiere resistencia a este antibiótico (TcR). *S. maltophilia* no es capaz de crecer a una concentración superior a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. WT, cepa silvestre *S. maltophilia* Sm18; C1 y C2, candidatas a mutantes del gen *smeZ*.

3.4 Las mutantes de SmeYZ presentan una sensibilidad distinta a antibióticos con respecto a la cepa silvestre.

Para evaluar las candidatas a mutantes de la bomba RND *smeZ* que pertenece al complejo tripartito SmeYZ (véase fig. 1.6, mapa genético), se realizaron cultivos con medios adicionados con antibióticos para los que anteriormente se ha descrito la participación de la bomba como mecanismo de resistencia (trimetoprima sulfametoxazol y kanamicina). Se evaluó el crecimiento en un medio con tetraciclina, debido a que es la resistencia provista por el plásmido que fue integrado al cromosoma.

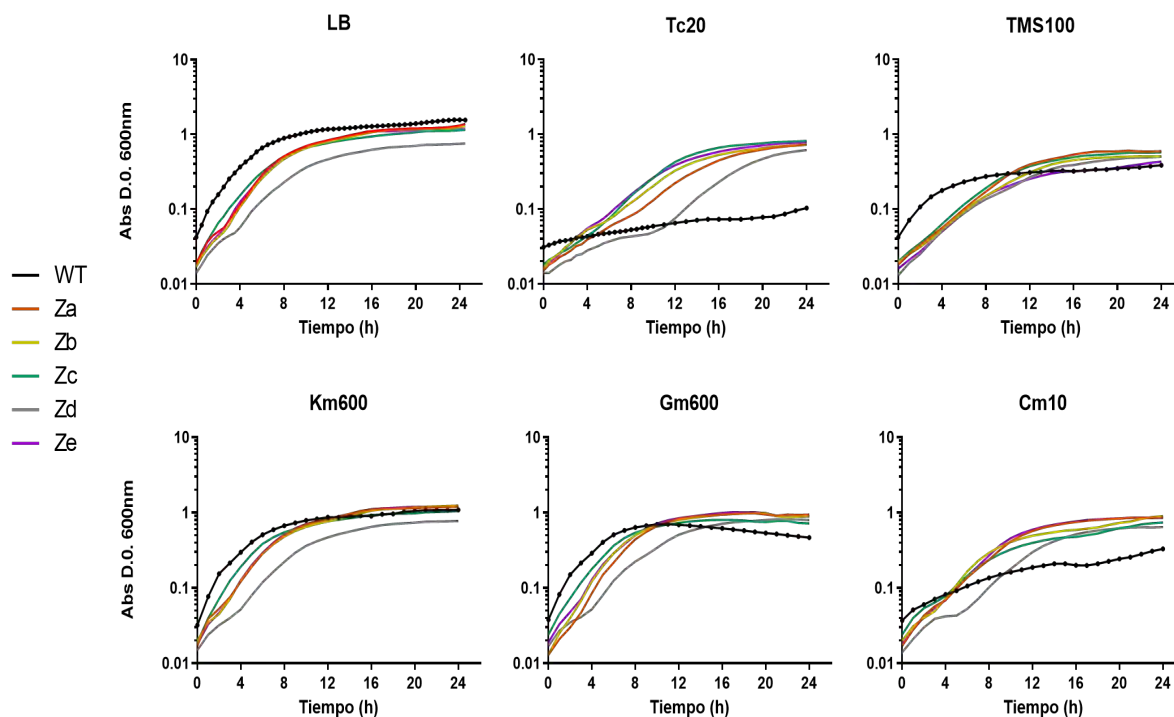
Se implementó cloranfenicol debido a que una evaluación fenotípica previa determinó que las mutantes SmeZ son capaces de crecer a 37 °C en medio sólido adicionado con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de este antibiótico, mientras que la cepa silvestre no presentó crecimiento. SmeYZ no ha sido reportado como un mecanismo que participe en la resistencia a cloranfenicol, sin embargo, *S. maltophilia* cuenta con otras bombas RND que si presentan una contribución en la resistencia a esta compuesto (SmeDEF y SmeVWX).

Se comparó el crecimiento de diferentes colonias candidatas a mutantes de SmeZ (Za, Zb, Zc, Zd y Ze) con respecto a la cepa silvestre. A partir de las curvas se obtuvo un parámetro cinético, la velocidad específica de crecimiento (μ) para evaluar la sensibilidad o el impacto de los antibióticos en el crecimiento (figura 3.16, b).

Con respecto a la densidad celular, el crecimiento de la cepa silvestre en tetraciclina fue menor en comparación a las mutantes. Esto ocurrió de acuerdo a lo esperado, sugiriendo la correcta integración del vector al cromosoma ya que anteriormente se había observado que Sm18 es sensible a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Tc. Sin embargo, al comparar las mutantes en los medios adicionados con antibióticos, no se observó una disminución o afectación en su crecimiento e incluso superaron la densidad celular observada en la cepa silvestre (figura 3.16, a).

Las velocidades de crecimiento (μ 's) fueron similares para todas las cepas en el medio control (LB). Con respecto a la respuesta a la trimetoprima, las cepas mutantes no presentaron la sensibilidad esperada, el crecimiento no se mostró realmente afectado, un caso similar se observó para la kanamicina y gentamicina. En medio adicionado con cloranfenicol se observó que la cepa silvestre creció más lento que las mutantes al comparar sus velocidades de crecimiento (figura 3.16, b), lo que resultó contrario a lo esperado ya que no se ha reportado a este antibiótico como sustrato de SmeYZ. En la siguiente sección se discuten cada uno de estos resultados (sección 4.3).

a



b

μ (h ⁻¹)				μ (h ⁻¹)			
Cepa	LB	Tc20	TMS100	Cepa	Km600	Gm600	Cm10
WT	0.354	0.049	0.234	WT	0.309	0.293	0.091
Za	0.366	0.212	0.270	Za	0.342	0.359	0.288
Zb	0.371	0.241	0.236	Zb	0.349	0.368	0.304
Zc	0.372	0.267	0.264	Zc	0.374	0.356	0.245
Zd	0.301	0.174	0.240	Zd	0.270	0.267	0.237
Ze	0.356	0.272	0.266	Ze	0.367	0.343	0.295

Figura 3.16: Evaluación fenotípica de las mutantes obtenidas de la bomba SmeZ. a) Cinéticas de crecimiento de Sm18 y las candidatas a mutantes de SmeZ en medio LB a 30°C para evaluar el efecto de diferentes antibióticos. WT, Sm18; Za-Ze, diferentes cepas de Sm18 *smeZ*::p512S_*smeZ* producto de mutagénesis por integración de vector. LB, medio LB sin antibiótico; Tc20, tetraciclina 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; TMS100, trimetoprima-sulfametoxazol 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Km600, kanamicina 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Gm600, gentamicina 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cm10, cloramfenicol 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. b) Tabla que presenta la velocidad de crecimiento μ (h⁻¹) de cada cepa en cada medio de cultivo.

Capítulo 4

Discusión

S. maltophilia es un patógeno oportunista emergente asociado principalmente a infecciones respiratorias. Los estudios respecto a esta bacteria se han centrado en aislados clínicos. Sin embargo, considerando que la especie posee una amplia distribución ambiental, resulta pertinente evaluar cepas obtenidas de entornos naturales. Además, entender su interacción con organismos con los que comparten el mismo entorno natural, podría proporcionar evidencias para sustentar la idea de que la bacteria haya adaptado o desarrollado mecanismos que finalmente le han permitido convertirse en un patógeno humano, un fenómeno que se ha sugerido para otros organismos como *Legionella* [89].

La patogenicidad de un organismo se exhibe cuando éste logra establecer una infección en su hospedero, siendo capaz de sobrevivir a los mecanismos de defensa a los que se enfrenta. Dentro de las estrategias que un patógeno emplea y que contribuyen a su virulencia se encuentran las bombas de eflujo, debido a que se ha descrito su contribución en procesos relacionados en la colonización, la protección de las defensas del hospedero y la producción de biopelículas. Estos procesos son relevantes en la virulencia exhibida por diferentes patógenos como: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholerae*, entre otras [64]. Es importante señalar que el estudio de las bombas se ha dirigido mayoritariamente a evaluar su contribución en la resistencia a antibióticos, no obstante, la caracterización de estos sistemas y su compleja regulación sugiere que intervienen en diferentes procesos fisiológicos más allá de la resistencia a antibióticos y que probablemente representan las funciones nativas que mediaban en ambientes naturales. En este sentido, el estudio de las bombas de eflujo en *S. maltophilia* y su posible contribución en la virulencia u otros procesos biológicos, no ha sido del todo explorado y descrito.

En el presente estudio, se evaluó la expresión de las bombas de eflujo de *S. maltophilia* Sm18, SmeABC y SmeYZ en la resistencia a antibióticos. Además, se realizó la visualización de la expresión de ambos operones durante la interacción con *A. castellanii* mediante microscopía óptica.

Las cepas de *S. maltophilia* Sm18 que expresan fusiones transcripcionales a *gfp* permitieron abordar dos objetivos: el primero consistió en evaluar la expresión de SmeABC y SmeYZ bajo condiciones de estrés. El segundo se concentró en estudiar la participación de las bombas en la supervivencia intracelular de Sm18 en *A. castellanii*.

4.1 SmeABC y SmeYZ desempeñan papeles fisiológicos distintos en *S. maltophilia* Sm18.

Se estudió si SmeABC y SmeYZ se expresan bajo condiciones que simulen condiciones a las que podría estar expuesta *S. maltophilia* al colonizar un hospedero. Se evaluaron factores como temperatura, la presencia de antibióticos o distintos valores de pH. Se detectó una expresión diferencial de las bombas conforme se desarrollaba el cultivo celular.

SmeABC no se expresa bajo las condiciones evaluadas.

La cepa evaluada en este estudio corresponde a un aislado ambiental en donde la bomba no se expresa (figura 3.6 y figura 3.7). Estas observaciones sugieren que la resistencia que Sm18 presenta a estos antibióticos (IM2, Km100) probablemente está mediada principalmente por otras bombas o por mecanismos diferentes (β -lactamasas o enzimas modificadoras de aminoglucósidos). Sin embargo, a partir de estos resultados, resulta evidente proponer una evaluación de concentraciones más elevadas de algunos antibióticos (Imipenem y Kanamicina) que permitieran determinar si existe alguna concentración en que la cepa requiera la acción de la bomba. Para esto, se podría implementar el uso de placas con múltiples pozos y un lector de microplacas con detección de intensidad de fluorescencia.

Con respecto a lo anteriormente reportado, este sistema de eflujo participa en la resistencia a aminoglucósidos, β -lactámicos y fluoroquinolonas en cepas mutantes multidrogo-resistentes de *S. maltophilia* ULA-511, lo que se determinó mediante la delección de *smeBC* [67]. Sin embargo, la delección de estos genes en la cepa silvestre no incrementó su susceptibilidad a estos antibióticos. Además, mediante RT-PCR confirmaron que el operón de la bomba no se expresa en la cepa silvestre y únicamente se detectó en las mutantes MDR que sobreexpresan este sistema [67]. Por lo tanto, al ser Sm18 una cepa ambiental no parece expresar SmeABC tal como se ha reportado para otras cepas silvestres y futuros estudios podrían dirigirse a evaluar bajo que condiciones es necesaria y los procesos fisiológicos en los que contribuye.

SmeYZ se expresó en todas las condiciones evaluadas de temperatura, presencia de antibióticos y distintos valores de pH.

Estos resultados son consistentes con los anteriormente reportados donde señalan que esta bomba se expresa de manera constitutiva en el aislado clínico *S. maltophilia* K279a

[72] y que participa no solo en la resistencia a aminoglucósidos, también en diversos papeles fisiológicos relacionados con la virulencia que exhibe esta cepa.

La fusión YZe corresponde a una región promotora más amplia a la usada en la fusión YZ y se realizó con la finalidad de identificar regiones reguladoras que podrían impactar en los niveles de expresión de las bombas. Sin embargo, en los alcances del presente proyecto solo se llegó a evaluar su expresión bajo las condiciones de estrés ya mencionadas. La expresión de YZe fue menor a la observada con YZ (figura 3.6 y figura 3.7), un fenómeno común en algunas de las condiciones probadas partiendo de inóculos ajustados a la misma densidad óptica. En este ensayo es importante considerar la densidad celular (crecimiento) entre las cepas y condiciones, para poder obtener una interpretación adecuada de la intensidad de fluorescencia atribuible a la expresión de las bombas. Los resultados obtenidos permitieron identificar algunas de las limitantes de la metodología implementada y proponer para futuros ensayos el uso de un instrumento que permita medir la intensidad de fluorescencia y monitorear la densidad celular de manera simultánea en cultivos líquidos.

De lo anterior se deduce que SmeYZ se expresa de manera constitutiva. No se detectó la expresión de SmeABC en la cepa silvestre Sm18, bajo las condiciones evaluadas y con la metodología implementada. De acuerdo a lo reportado en la literatura, la expresión de esta bomba únicamente se ha identificado en mutantes multidrogo-resistentes o aislados clínicos donde contribuye a la resistencia a antibióticos [67].

4.2 El co-cultivo de *A. castellanii* y *S. matophilia* permite visualizar posibles eventos de supervivencia intracelular.

El ensayo de la interacción de *S. matophilia* con *A. castellanii* se evaluó mediante microscopía de epi-fluorescencia para visualizar la supervivencia intracelular de la bacteria en este modelo. La asociación de este organismo con amebas de vida libre se ha reportado anteriormente y diferentes estudios han proporcionado evidencia para considerarla ameba-resistente [86, 117, 93, 17]. Los ensayos de co-cultivo permitieron empezar a adaptar los protocolos reportados, sin embargo, a partir de los resultados se detectaron varias limitantes que se mencionan a continuación.

- 1.- La presencia de células en proceso de enquistamiento a tiempos tempranos de co-cultivo (figura 3.9) demostró que el inóculo de la ameba no fue adecuado y es necesario monitorear no solo el tiempo de cultivo, también evaluar que las células se encuentren en un estado metabólicamente activo como trofozoitos para que logren depredar las bacterias del medio.

- 2.-La evaluación de la supervivencia intracelular no fue precisa, la técnica de micro-

scopía de epi-fluorescencia implementada no permitió definir si las bacterias se encuentran dentro de la ameba o en un plano superior a ella. En esta técnica un haz de luz paralelo pasa directamente a través de la muestra, maximizando la iluminación (microscopía de campo amplio, *widefield*), lo que la posiciona como una buena alternativa para muestras de cierto grosor, más de 10 micras de profundidad. Entonces, la sección óptica que se obtiene es amplia, la iluminación es intensa y la excitación de las moléculas fuera del plano focal puede generar imágenes con una alta señal de fondo. De esta manera, la técnica limita la precisa localización de las moléculas fluorescentes y no permite la interpretación de datos espaciales en tres dimensiones, debido a que cualquier luz fuera de foco también es colectada. Estas razones llevan a sugerir la implementación de microscopía confocal en donde sea posible controlar la profundidad del campo de observación, impedir la colecta de luz fuera de foco y obtener una serie de secciones ópticas de la muestra. Adicionalmente, la microscopía electrónica también podría proveer información útil principalmente para poder observar los espacios subcelulares en donde se alojan las bacterias.

3.- Finalmente, la baja frecuencia de trofozoitos y quistes fluorescentes observados podría deberse a la pérdida del plásmido que porta a *gfp*, además considerando que el replicador es RK2, se trata de un plásmido de bajo número de copia que fácilmente puede ser perdido por la población bacteriana. Se han planteado futuros estudios que implementen cepas marcadas de manera estable (integración cromosómica) para expresar constitutivamente a un gen reportero (*gfp*).

Debido a lo anterior, es evidente que es necesario optimizar protocolos y migrar a técnicas de microscopía adecuadas para alcanzar los objetivos planteados. Sin embargo, el estudio de patógenos humanos usando como modelo a *A. castellanii* resulta viable y ya se ha realizado previamente, principalmente con aquellos organismos con los que comparte un ambiente natural por lo que la evidencia proporcionada podría resultar útil para guiar y proponer futuros ensayos. En este sentido, se ha reportado la detección intracelular de *Vibrio cholerae* en *A. castellanii* [89]. Los ensayos demostraron la resistencia a la digestión de una fracción de la población bacteriana, la cual es liberada nuevamente al medio o de manera alternativa, logra alojarse en la vacuola contráctil de la ameba y le sirve como nicho de replicación, un fenómeno que se mantuvo incluso durante el enquistamiento [89]. La proliferación ocurre primero dentro de la vacuola contráctil, la bacteria escapa al citosol del quiste mediante la ruptura de la vacuola y finalmente, se produce la lisis celular [89]. De manera especulativa se podría pensar que el fenómeno de replicación intracelular se produjo en los quistes fluorescentes que se observaron en los co-cultivos entre Sm18 y *A. castellanii* Neff presentados en este estudio (figura 3.10) a tiempos tardíos (48 hpi y 96 hpi). Sin embargo, con los resultados obtenidos no fue posible observar compartimentos intracelulares en donde posiblemente pudo alojarse la bacteria o si se encontraba distribuida en todo el espacio citosólico. Es importante mencionar que los "quistes fluorescentes" solo se observaron en cepas Sm18, mientras que en *E. coli* no se detectaron eventos similares en ninguna de las dos MOI implementadas (Anexo B), no obstante, se requieren más ensayos para confirmar esto.

Futuros ensayos podrían destinarse a marcar espacios subcelulares donde se presume la internalización de bacterias y que permitan trazar la vía fagocítica durante la depredación de *S. maltophilia*. Principalmente, es necesario mejorar el protocolo y partir de un cultivo sincronizado en un estado de depredación activo, además de considerar que el medio de cultivo (PAS) también ocasiona enquistamiento.

La evaluación de la expresión de las bombas de flujo en la invasión de *A. castellanii*, se propuso partiendo de la idea de que la adaptación de *S. maltophilia* al ambiente intracelular debe involucrar varios mecanismos celulares, entre los que se encuentran las BsE. En la literatura se reportan las implicaciones de diferentes sistemas de flujo en la virulencia de organismos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, *Salmonella typhimurium*, entre otros [64]. Sin embargo, los estudios de las bombas de *S. maltophilia* en este contexto son escasos, pero han proporcionado evidencia para sugerir su potencial contribución en la colonización de las amebas. Un reporte demostró que sobrenadantes provenientes de co-cultivos entre *S. maltophilia* BurE1 y *A. castellanii* inducen la sobreexpresión de tres genes: *smeE*, *smeN* y *smeZ* que forman parte de los operones de las bombas de flujo SmeDEF, SmeMN y SmeYZ, respectivamente [118]. No obstante, aún resulta necesario profundizar en determinar si estas bombas directamente contribuyen en la supervivencia de la bacteria frente a los mecanismos de defensa del hospedero y para eso fue planteado el presente proyecto.

A partir de las imágenes obtenidas se deduce, que de manera similar a las condiciones de estrés evaluadas, SmeYZ se expresó constitutivamente incluso antes de la interacción con la ameba (figura 3.13, 1 hpi). Conforme transcurrió el tiempo de co-cultivo nuevamente se identificaron porciones de quistes con bacterias presuntamente internalizadas. A las 72 hpi se detectó una ameba que podría contener bacterias distribuidas en su interior, sin embargo, hasta este momento no es posible concluir que esto corresponde a la replicación intracelular de *S. maltophilia*. En el caso de SmeABC únicamente se detectó su expresión a tiempos muy tardíos del co-cultivo (figura 3.12), pero nuevamente los eventos fueron escasos. La imagenología obtenida no proporciona suficiente evidencia que la expresión de las bombas esté directamente ligada a la supervivencia intracelular en *A. castellanii*, sin embargo, podría considerarse como punto de partida debido a que la propuesta de ensayos *in vivo* para visualización de la contribución de ambas bombas mediante microscopía óptica resulta novedosa y viable.

Los ensayos de co-cultivo resultaron útiles para comenzar a plantear la optimización de los protocolos experimentales que permitan responder las interrogantes planteadas en el proyecto. Se identificaron puntos críticos para que la depredación resulte exitosa y poder evaluar el comportamiento intracelular de la bacteria y de los mecanismos que emplea durante la interacción con la ameba. En adelante, es esencial identificar compartimentos intracelulares para determinar en que espacio se alojan las bacterias y de que manera evaden, si es que lo hacen, la vía fagocítica de *A. castellanii*.

4.3 Mutantes de SmeZ no presentaron un incremento en la susceptibilidad a antibióticos

La resistencia a antibióticos es un fenotipo complejo de estudiar, principalmente por los múltiples mecanismos que intervienen y por la interconectada regulación de los genes involucrados. En ocasiones, lo anterior podría complicar estudiar el efecto o el impacto que produce algún mecanismo de manera individual o aislada. Sin embargo, como primeras aproximaciones, resulta de utilidad lograr evaluar la contribución de alguno de los múltiples mecanismos que emplean las bacterias para resistir la acción de agentes que les resultan nocivos o tóxicos y con esa finalidad se decidió realizar la evaluación de mutantes de una de las bombas (SmeYZ).

Se realizó la evaluación fenotípica de las mutantes con respecto a la cepa control. La resistencia a tetraciclina se mantuvo en todas las mutantes seleccionadas, indicando que debió haberse realizado la integración del plásmido al cromosoma ya que la cepa silvestre es sensible a este antibiótico a una concentración mayor a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina (figura 3.16, a Tc20).

La respuesta frente a los antibióticos para los que se ha descrito la participación de SmeYZ resultó contraria a lo esperado. Se había reportado un incremento en la susceptibilidad de las mutantes de esta bomba a los aminoglucósidos (kanamicina y gentamicina) y a trimetoprima/sulfametoxazol (TMS), algo que evidentemente no ocurrió en los ensayos realizados (figura 3.16, a). No obstante, futuros ensayos podrían contribuir al evaluar un rango más amplio de concentraciones o empleando otro conjunto de antibióticos.

Los resultados obtenidos permitieron abordar diferentes cuestiones:

Sm18 podría recurrir a otros complejos para compensar el efecto de la falta de acción de SmeZ. Es sabido que las BsE son inespecíficas y mantienen una regulación interconectada. La inhibición o delección de una bomba podría impactar en los niveles de expresión de las demás, produciendo efectos variables en la resistencia a cierto tipo de antibióticos o en otros procesos fisiológicos [63].

La resistencia a aminoglucósidos y TMS, recae principalmente sobre otros mecanismos presentes en *S. maltophilia*. Los resultados sugieren que el complejo SmeYZ en la cepa ambiental evaluada (Sm18) podría estar involucrado en diferentes procesos fisiológicos y no únicamente se concentra en mediar la resistencia a antibióticos. Futuros estudios podrían ser dirigidos en este sentido, sumándose a los esfuerzos de entender el papel que han mantenido estas bombas en ambientes naturales desde antes que la intervención humana fuera relevante.

El incremento en la resistencia a cloranfenicol (Cm) de la mutante resultó inesperado,

SmeYZ no está relacionada a este antibiótico y mutantes de esta bomba en otros aislados no incrementaron su resistencia a este compuesto [74]. Los sistemas de eflujo que sí están descritos como mecanismos de resistencia a Cm en *S. maltophilia* son SmeDEF y SmeVWX, y podría ser posible que una de ellas o ambas estén ejerciendo su acción en mayor medida en las cepas mutantes, ya que al observar a la cepa silvestre esta sí presentó una susceptibilidad a este antibiótico (figura 3.16, a Cm10). Sin embargo, es necesario realizar estudios posteriores que permitan sustentar el fenotipo observado. Anteriormente, se había reportado que la delección de SmeYZ no incrementó la resistencia a cloranfenicol [74, 80]. Sin embargo, la inactivación de *smeRySy* el sistema regulador de dos componentes que es transcrito de manera divergente a la bomba SmeYZ, causó una disminución en la expresión de esta bomba y a la vez incrementó la de SmeDEF en el aislado clínico *S. maltophilia* KJ. Como consecuencia, la mutante presentó mayor susceptibilidad a aminoglucósidos pero incrementó su resistencia a cloranfenicol al compararse con la cepa silvestre [80]. Estos resultados sustentan que la regulación de las BsE es coordinada a diferentes niveles, una razón importante del por qué la evaluación fenotípica muchas veces resulta compleja.

Capítulo 5

Conclusiones

El presente estudio contribuye en la evaluación de SmeABC y SmeYZ en la resistencia a antibióticos de Sm18 y en su expresión durante la interacción con una ameba de vida libre. Ambas bombas fueron identificadas como específicas de *S. maltophilia* por el análisis genómico que permitió el planteamiento del proyecto (Vinuesa et. al, en prep.). Los resultados demostraron que SmeYZ se expresa en diferentes condiciones de temperatura, pH y en presencia de antibióticos. Sin embargo, SmeABC no se expresó en ninguna de las condiciones evaluadas y aún falta determinar en que procesos fisiológicos interviene en la cepa Sm18.

El fenotipo observado de las mutantes de SmeYZ fue contrario a lo esperado, no presentaron mayor susceptibilidad a los antibióticos probados y para los cuáles está reportado que SmeYZ contribuye en su resistencia. Se especula que este fenómeno podría deberse a la participación de otros mecanismos que podrían compensar la falta de acción de esta bomba.

Finalmente, debido a que Sm18 es una cepa ambiental aislada de un entorno clasificado como baja contaminación antropogénica [39], resulta interesante para evaluar los mecanismos que probablemente ha empleado o adaptado durante su interacción con amebas, debido a que estos organismos regulan la población bacteriana en el ambiente mediante la depredación. Las bombas de flujo han sido estudiadas principalmente en la resistencia a antibióticos. Sin embargo, se consideró importante comenzar a plantear ensayos que permitieran evaluar si existe una posible participación de estos mecanismos en su virulencia. Para ello, primero era necesario escoger un modelo que permitiera estudiar esta interacción y establecer los protocolos necesarios para cumplir dicho fin, lo que constituye una de las aproximaciones presentadas en este proyecto. No obstante, los resultados obtenidos no permiten determinar que la expresión de ambas bombas esté directamente involucrada en la supervivencia intracelular de la bacteria.

Capítulo 6

Perspectivas

La evaluación de la expresión de las bombas mediante el uso de un gen reportero fluorescente resultó viable, sin embargo, los ensayos demostraron que sería útil monitorear simultáneamente la densidad celular para obtener una adecuada interpretación de los resultados. Se sugiere migrar a un sistema que permita evaluar la intensidad de fluorescencia simultáneamente al crecimiento microbiano. Existen lectores de microplacas que permiten realizar este estudio. Además, se podría evaluar un mayor número de condiciones, lo que resultaría principalmente útil para detectar la expresión de SmeABC o probar un rango más amplio de concentraciones de antibióticos.

La visualización de los ensayos de co-cultivo mediante microscopía óptica abren un panorama de oportunidad para evaluar la interacción entre *A. castellanii* y Sm18 *in vivo*. No obstante, es necesario mejorar los protocolos e implementar técnicas de microscopía que permitan evaluar de manera concreta la internalización de la bacteria en la ameba. Por lo anterior, para futuros estudios se ha propuesto el uso de microscopía confocal y la implementación de cepas con el gen reportero integrado al cromosoma para así evitar la dependencia al uso de plásmidos. Además, mediante un marcaje de compartimentos intracelulares en donde se presume se alojan las bacterias, podría visualizarse si logran resistir la digestión o evadir la vía fagocítica en *A. castellanii*.

Debido a que resulta de principal interés poder rastrear intracelularmente a las bacterias, una posible estrategia sería generar cepas de Sm18 que expresen una proteína fotoconvertible, que al ser expuesta a cierta longitud de onda sea capaz de cambiar irreversiblemente su espectro de emisión. De esta manera, se podrían seleccionar regiones de interés (compartimentos intracelulares) en donde se detecte presencia de bacterias, realizar la fotoconversión y posteriormente monitorear su localización o distribución con respecto al tiempo de cultivo.

Otra de las interrogantes presentes durante los ensayos realizados en este estudio, consistió en determinar si realmente las bacterias sobreviven intracelularmente. Para atender esta cuestión se podría implementar el kit LIVE/DEAD BacLight, compuesto por dos col-

orantes que permiten determinar la viabilidad bacteriana en función de la integridad de la membrana durante los ensayos de microscopía de fluorescencia. Adicionalmente, la técnica de recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo o FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) también permitiría evaluar la síntesis *de novo* del reportero fluorescente (gfp) como una manera de determinar la viabilidad de las cepas que expresen esta proteína.

Con respecto a las mutantes, se decidió cambiar de plásmido para la estrategia de VIM y se utilizó el $pX\Delta sacB_Pemgfp$, derivado de pEX18Tc, en donde se eliminó a *sacB* y se insertó *gfp* bajo el promotor Pem. Esto permitió seleccionar colonias transformantes por técnicas de biología molecular y mediante detección de fluorescencia. Sin embargo, las cepas resultantes y probables mutantes de la bomba SmeZ y otras dos bombas presuntamente involucradas en la respuesta a metales (SmmA y SmmQ) quedan en proceso de la evaluación fenotípica y para futuros ensayos. Adicionalmente, podrían implementarse estrategias de delección libre de marcas de los genes de las bombas y también sería importante evaluar la interacción que mantienen las mutantes con las amebas, con respecto a las cepas silvestres.

Referencias

- [1] World Health Organization. Antimicrobial resistance (2021). URL <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- [2] World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed (2017). URL <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- [3] World Health Organization. WHO methodology for point prevalence survey on antibiotic use in hospitals. Technical documents, World Health Organization (2018). URL <https://apps.who.int/iris/handle/10665/280063>.
- [4] World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections : a practical guide / editors : G. Duce, J. Fabry and L. Nicolle (2002). URL https://apps.who.int/iris/handle/10665/67350?search-result=true{%&}query=prevention+of+hospital+acquired+infections{%&}scope={%&}rpp=10{%&}sort{_%}by=score{%&}order=desc.
- [5] Coenye, T., Vanlaere, E., Falsen, E. & Vandamme, P. *Stenotrophomonas africana* Drancourt et al. 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bardbury 1993. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1235–1237 (2004). URL <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.63093-0>.
- [6] Looney, W. J., Narita, M. & Mühlemann, K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *The Lancet. Infectious diseases* **9**, 312–323 (2009). URL [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70083-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70083-0).
- [7] Paez, J. I. G. & Costa, S. F. Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *The Journal of hospital infection* **70**, 101–108 (2008). URL <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.05.020>.
- [8] Brooke, J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clinical microbiology reviews* **25**, 2–41 (2012). URL <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-11>.

- [9] Webber, M. A. & Piddock, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**, 9–11 (2003). URL <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>.
- [10] Alav, I., Sutton, J. M. & Rahman, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **73**, 2003–2020 (2018). URL <https://doi.org/10.1093/jac/dky042>.
- [11] Alcalde-Rico, M., Hernando-Amado, S., Blanco, P. & Martínez, J. L. Multidrug Efflux Pumps at the Crossroad between Antibiotic Resistance and Bacterial Virulence. *Frontiers in microbiology* **7**, 1483 (2016). URL <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01483>.
- [12] Nikaido, H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual review of biochemistry* **78**, 119–146 (2009). URL <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923>.
- [13] Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C. & Göker, M. List of prokaryotic names with standing in nomenclature (lpsn) moves to the dsmz. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **70**, 5607–5612 (2020). URL <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004332>.
- [14] Vinuesa, P., Ochoa-Sánchez, L. E. & Contreras-Moreira, B. GET-PHYLOMARKERS, a Software Package to Select Optimal Orthologous Clusters for Phylogenomics and Inferring Pan-Genome Phylogenies, Used for a Critical Geno-Taxonomic Revision of the Genus *Stenotrophomonas*. *Frontiers in microbiology* **9**, 771 (2018). URL <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00771>.
- [15] De Vidipó, L. A., De Marques, E. A., Puchelle, E. & Plotkowski, M. C. *Stenotrophomonas maltophilia* interaction with human epithelial respiratory cells in vitro. *Microbiology and immunology* **45**, 563–569 (2001). URL <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb01287.x>.
- [16] Pompilio, A. *et al.* Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC microbiology* **10**, 102 (2010). URL <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-102>.
- [17] Corsaro, D., Müller, K.-D. & Michel, R. Molecular characterization and ultrastructure of a new amoeba endoparasite belonging to the *stenotrophomonas maltophilia* complex. *Experimental parasitology* **133**, 383–390 (2013). URL <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.016>.
- [18] Roscetto, E. *et al.* In vitro interaction of *stenotrophomonas maltophilia* with human monocyte-derived dendritic cells. *Frontiers in Microbiology* **6** (2015). URL <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00723>.

- [19] Takahashi, I. *et al.* Persistent colonization of non-lymphoid tissue-resident macrophages by *Stenotrophomonas maltophilia*. *International Immunology* **32**, 133–141 (2019). URL <https://doi.org/10.1093/intimm/dxz071>.
- [20] Ryan, R. P. *et al.* The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature reviews. Microbiology* **7**, 514–525 (2009). URL <https://doi.org/10.1038/nrmicro2163>.
- [21] Banerjee, Manas Ranjan; Yesmin, Laila. Sulfur-oxidizing plant growth promoting rhizobacteria for enhanced canola performance (2002). URL <https://patents.google.com/patent/US7491535B2/en#{#}patentCitations>.
- [22] Ikemoto, S., Suzuki, K., Kaneko, T. & Komagata, K. Characterization of strains of *Pseudomonas maltophilia* which do not require methionine. *International Journal of Systematic Bacteriology* **30**, 437–447 (1980). URL <https://doi.org/10.1099/00207713-30-2-437>.
- [23] Park, M. *et al.* Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiological Research* **160**, 127–133 (2005). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501304001028>.
- [24] Mukherjee, P. & Roy, P. Genomic potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. *Frontiers in Microbiology* **7** (2016). URL <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00967>.
- [25] Chauviat, A., Meyer, T. & Favre-Bonté, S. Versatility of *Stenotrophomonas maltophilia*: Ecological roles of rnd efflux pumps. *Heliyon* **9**, e14639 (2023). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844023018467>.
- [26] Anaissie, E. J., Penzak, S. R. & Dignani, M. C. The Hospital Water Supply as a Source of Nosocomial Infections: A Plea for Action. *Archives of Internal Medicine* **162**, 1483–1492 (2002). URL <https://doi.org/10.1001/archinte.162.13.1483>.
- [27] Cateau, E. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* and *vermamoeba vermiformis* relationships: Bacterial multiplication and protection in amoebal-derived structures. *Research in Microbiology* **165**, 847–851 (2014). URL <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.10.004>.
- [28] Berg, G., Eberl, L. & Hartmann, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental microbiology* **7**, 1673–1685 (2005). URL <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x>.
- [29] Albin, Abril, Franchini, Hüsey & Filioussis. *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from the airways of animals with chronic respiratory disease. *Schweizer Archiv für*

- Tierheilkunde* **151**, 323–328 (2009). URL <https://doi.org/10.1024/0036-7281.151.7.323>. PMID: 19565454.
- [30] Adegoke, A. A., Stenström, T. A. & Okoh, A. I. Stenotrophomonas maltophilia as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. *Frontiers in microbiology* **8**, 2276 (2017). URL <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02276>.
- [31] Pages, D. *et al.* Heavy metal tolerance in stenotrophomonas maltophilia. *PLOS ONE* **3**, 1–6 (2008). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001539>.
- [32] Crossman, L. C. *et al.* The complete genome, comparative and functional analysis of Stenotrophomonas maltophilia reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome biology* **9**, R74 (2008). URL <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-4-r74>.
- [33] Rocco, F., De Gregorio, E., Colonna, B. & Di Nocera, P. P. Stenotrophomonas maltophilia genomes: A start-up comparison. *International Journal of Medical Microbiology* **299**, 535–546 (2009). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438422109000538>.
- [34] Sanchez, M. B., Hernandez, A. & Martinez, J. L. Stenotrophomonas maltophilia drug resistance. *Future microbiology* **4**, 655–660 (2009). URL <https://doi.org/10.2217/fmb.09.45>.
- [35] Martínez, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science (New York, N.Y.)* **321**, 365–367 (2008). URL <https://doi.org/10.1126/science.1159483>.
- [36] Botes, E., Van Heerden, E. & Litthauer, D. Hyper-resistance to arsenic in bacteria isolated from an antimony mine in South Africa. *South African Journal of Science* **103**, 279–281 (2007).
- [37] Youenou, B. *et al.* Comparative Genomics of Environmental and Clinical Stenotrophomonas maltophilia Strains with Different Antibiotic Resistance Profiles. *Genome Biology and Evolution* **7**, 2484–2505 (2015). URL <https://doi.org/10.1093/gbe/evv161>.
- [38] Pedrosa-Silva, F., Matteoli, F. P., Passarelli-Araujo, H., Olivares, F. L. & Venancio, T. M. Genome sequencing of the vermicompost strain stenotrophomonas maltophilia uenf-4gii and population structure analysis of the s. maltophilia sm3 genogroup. *Microbiological Research* **255**, 126923 (2022). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501321002299>.
- [39] Ochoa-Sánchez, L. E. & Vinuesa, P. Evolutionary Genetic Analysis Uncovers Multiple Species with Distinct Habitat Preferences and Antibiotic Resistance Phenotypes

- in the *Stenotrophomonas maltophilia* Complex. *Frontiers in microbiology* **8**, 1548 (2017). URL <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01548>.
- [40] Chang, Y.-T., Lin, C.-Y., Chen, Y.-H. & Hsueh, P.-R. Update on infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia* with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options. *Frontiers in microbiology* **6**, 893 (2015). URL <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00893>.
- [41] Gould, V. C., Okazaki, A. & Avison, M. B. β -Lactam resistance and β -lactamase expression in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates having defined phylogenetic relationships. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**, 199–203 (2006). URL <https://doi.org/10.1093/jac/dki453>.
- [42] Berg, G., Marten, P. & Ballin, G. *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape — occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiological Research* **151**, 19–27 (1996). URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501396800516>.
- [43] Juhnke, M. E. & des Jardin, E. Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 747 LP – 750 (1989). URL <http://aem.asm.org/content/55/3/747.abstract>.
- [44] Elvers, K. T., Leeming, K. & Lappin-Scott, H. M. Binary culture biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **26**, 178–183 (2001). URL <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000100>.
- [45] Jucker, B. A., Harms, H. & Zehnder, A. J. Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Journal of bacteriology* **178**, 5472–5479 (1996). URL <https://doi.org/10.1128/jb.178.18.5472-5479.1996>.
- [46] de Oliveira-Garcia, D. *et al.* Characterization of flagella produced by clinical strains of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Emerging infectious diseases* **8**, 918–923 (2002). URL <https://doi.org/10.3201/eid0809.010535>.
- [47] de Oliveira-Garcia, D. *et al.* Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cellular microbiology* **5**, 625–636 (2003). URL <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00306.x>.
- [48] Potera, C. Forging a link between biofilms and disease. *Science* **283**, 1837,1839 (1999). URL <https://doi.org/10.1126/science.283.5409.1837>.

- [49] Martínez, J. L. & Baquero, F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical microbiology reviews* **15**, 647–679 (2002). URL <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.647-679.2002>.
- [50] Monroe, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS biology* **5**, e307 (2007). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307>.
- [51] Abraham, W.-R. Going beyond the Control of Quorum-Sensing to Combat Biofilm Infections. *Antibiotics (Basel, Switzerland)* **5** (2016). URL <https://doi.org/10.3390/antibiotics5010003>.
- [52] Windhorst, S. *et al.* The major extracellular protease of the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*: characterization of the protein and molecular cloning of the gene. *The Journal of biological chemistry* **277**, 11042–11049 (2002). URL <https://doi.org/10.1074/jbc.M109525200>.
- [53] Figueirêdo, P. M. S. *et al.* Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. *Letters in applied microbiology* **43**, 443–449 (2006). URL <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01965.x>.
- [54] Zhu, H., Thuruthyil, S. J. & Willcox, M. D. P. Production of N-acyl homoserine lactones by Gram-negative bacteria isolated from contact lens wearers. *Clinical & Experimental Ophthalmology* **29**, 150–152 (2001). URL <https://doi.org/10.1046/j.1442-9071.2001.00397.x>.
- [55] Vfselova, M. *et al.* Production of N-acylhomoserine lactone signal molecules by gram-negative soil-borne and plant-associated bacteria. *Folia microbiologica* **48**, 794–798 (2003). URL <https://doi.org/10.1007/BF02931516>.
- [56] Newman, K. L., Almeida, R. P. P., Purcell, A. H. & Lindow, S. E. Cell-cell signaling controls *Xylella fastidiosa* interactions with both insects and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1737–1742 (2004). URL <https://doi.org/10.1073/pnas.0308399100>.
- [57] Huedo, P. *et al.* Decoding the genetic and functional diversity of the DSF quorum-sensing system in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in microbiology* **6**, 761 (2015). URL <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00761>.
- [58] Suppiger, A. *et al.* The DSF type quorum sensing signalling system RpfF/R regulates diverse phenotypes in the opportunistic pathogen *Cronobacter*. *Scientific reports* **6**, 18753 (2016). URL <https://doi.org/10.1038/srep18753>.
- [59] Huedo, P. *et al.* Two different rpf clusters distributed among a population of *Stenotrophomonas maltophilia* clinical strains display differential diffusible signal factor production and virulence regulation. *Journal of bacteriology* **196**, 2431–2442 (2014). URL <https://doi.org/10.1128/JB.01540-14>.

- [60] García, C. A., Alcaraz, E. S., Franco, M. A. & Passerini de Rossi, B. N. Iron is a signal for *Stenotrophomonas maltophilia* biofilm formation, oxidative stress response, OMPs expression, and virulence. *Frontiers in microbiology* **6**, 926 (2015). URL <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00926>.
- [61] Ryan, R. P. *et al.* Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology* **68**, 75–86 (2008). URL <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06132.x>.
- [62] Ryan, R. P. & Dow, J. M. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology (Reading, England)* **154**, 1845–1858 (2008). URL <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017871-0>.
- [63] Du, D. *et al.* Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature reviews. Microbiology* **16**, 523–539 (2018). URL <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>.
- [64] Dinesh, M. F. & Ayush, K. Resistance-nodulation-division multidrug efflux pumps in gram-negative bacteria: Role in virulence. *Antibiotics* **2**, 163–181 (2013). URL <https://www.mdpi.com/2079-6382/2/1/163>.
- [65] Tseng, T. T. *et al.* The *rnd* permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* **1** **1**, 107–25 (1999). URL <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10941792/>.
- [66] Blanco, P. *et al.* Bacterial multidrug efflux pumps: Much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms* **4** (2016). URL <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010014>.
- [67] Li, X.-Z., Zhang, L. & Poole, K. SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **46**, 333–343 (2002). URL <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.333-343.2002>.
- [68] Alonso, A. & Martínez, J. L. Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**, 3079–3086 (2000). URL <https://doi.org/10.1128/AAC.44.11.3079-3086.2000>.
- [69] Hernández, A. *et al.* Structural and functional analysis of SmeT, the repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. *The Journal of biological chemistry* **284**, 14428–14438 (2009). URL <https://doi.org/10.1074/jbc.M809221200>.

- [70] García-León, G. *et al.* A function of SmeDEF, the major quinolone resistance determinant of *Stenotrophomonas maltophilia*, is the colonization of plant roots. *Applied and environmental microbiology* **80**, 4559–4565 (2014). URL <https://doi.org/10.1128/AEM.01058-14>.
- [71] Chen, C.-H. *et al.* Contribution of resistance-nodulation-division efflux pump operon smeU1-V-W-U2-X to multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **55**, 5826–5833 (2011). URL <https://doi.org/10.1128/AAC.00317-11>.
- [72] Gould, V. C., Okazaki, A. & Avison, M. B. Coordinate hyperproduction of SmeZ and SmeJK efflux pumps extends drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **57**, 655–657 (2013).
- [73] Huang, Y.-W., Liou, R.-S., Lin, Y.-T., Huang, H.-H. & Yang, T.-C. A linkage between SmeLJK efflux pump, cell envelope integrity, and σ E-mediated envelope stress response in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PloS one* **9**, e111784 (2014). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111784>.
- [74] Lin, Y.-T., Huang, Y.-W., Chen, S.-J., Chang, C.-W. & Yang, T.-C. The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **59**, 4067–4073 (2015). URL <https://doi.org/10.1128/AAC.00372-15>.
- [75] Lin, C.-W., Huang, Y.-W., Hu, R.-M. & Yang, T.-C. SmeOP-TolCSm efflux pump contributes to the multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **58**, 2405–2408 (2014). URL <https://doi.org/10.1128/AAC.01974-13>.
- [76] Al-Hamad, A., Upton, M. & Burnie, J. Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **64**, 731–734 (2009). URL <https://doi.org/10.1093/jac/dkp271>.
- [77] Lin, Y.-T., Huang, Y.-W., Liou, R.-S., Chang, Y.-C. & Yang, T.-C. MacABCsm, an ABC-type tripartite efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* involved in drug resistance, oxidative and envelope stress tolerances and biofilm formation. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **69**, 3221–3226 (2014). URL <https://doi.org/10.1093/jac/dku317>.
- [78] Huang, Y.-W., Hu, R.-M., Chu, F.-Y., Lin, H.-R. & Yang, T.-C. Characterization of a major facilitator superfamily (MFS) tripartite efflux pump EmrCABsm from *Stenotrophomonas maltophilia*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **68**, 2498–2505 (2013). URL <https://doi.org/10.1093/jac/dkt250>.

- [79] Hu, R.-M., Liao, S.-T., Huang, C.-C., Huang, Y.-W. & Yang, T.-C. An inducible fusaric acid tripartite efflux pump contributes to the fusaric acid resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS one* **7**, e51053 (2012). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051053>.
- [80] Wu, C.-J., Huang, Y.-W., Lin, Y.-T., Ning, H.-C. & Yang, T.-C. Inactivation of smesyry two-component regulatory system inversely regulates the expression of smeyz and smedef efflux pumps in *stenotrophomonas maltophilia*. *PLOS ONE* **11**, 1–14 (2016). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160943>.
- [81] Pereira, T. C. *et al.* Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)* **4** (2018). URL <https://doi.org/10.3390/jof4040128>.
- [82] Nicoletti, M. *et al.* *Stenotrophomonas maltophilia* strains from cystic fibrosis patients: genomic variability and molecular characterization of some virulence determinants. *International journal of medical microbiology : IJMM* **301**, 34–43 (2011). URL <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.07.003>.
- [83] Ferrer-Navarro, M. *et al.* Abundance of the Quorum-Sensing Factor Ax21 in Four Strains of *Stenotrophomonas maltophilia* Correlates with Mortality Rate in a New Zebrafish Model of Infection. *PLoS one* **8**, e67207 (2013). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067207>.
- [84] Rodríguez-Zaragoza, S. Ecology of free-living amoebae. *Critical reviews in microbiology* **20**, 225–241 (1994). URL <https://doi.org/10.3109/10408419409114556>.
- [85] Matz, C. & Kjelleberg, S. Off the hook—how bacteria survive protozoan grazing. *Trends in microbiology* **13**, 302–307 (2005). URL <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>.
- [86] Greub, G. & Raoult, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews* **17**, 413–433 (2004). URL <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>.
- [87] Jacquier, N., Aeby, S., Lienard, J. & Greub, G. Discovery of new intracellular pathogens by amoebal coculture and amoebal enrichment approaches. *Journal of visualized experiments : JoVE* e51055 (2013). URL <https://dx.doi.org/10.3791/51055>.
- [88] Siddiqui, R., Yee Ong, T. Y., Jung, S. Y. & Khan, N. A. *Acanthamoeba castellanii* interactions with *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Experimental parasitology* **183**, 128–132 (2017). URL <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.08.005>.

- [89] Van der Henst, C., Scignari, T., Maclachlan, C. & Blokesch, M. An intracellular replication niche for *Vibrio cholerae* in the amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *The ISME journal* **10**, 897–910 (2016). URL <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.165>.
- [90] Tyson, J. Y. *et al.* Multiple *Legionella pneumophila* Type II secretion substrates, including a novel protein, contribute to differential infection of the amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Hartmannella vermiformis*, and *Naegleria lovaniensis*. *Infection and immunity* **81**, 1399–1410 (2013). URL <https://doi.org/10.1128/IAI.00045-13>.
- [91] Zarei, M., Ghahfarokhi, M. E., Fazlara, A. & Bahrami, S. Effect of the bacterial growth phase and coculture conditions on the interaction of *Acanthamoeba castellanii* with *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, and *Shigella sonnei*. *Journal of basic microbiology* **59**, 735–743 (2019). URL <https://doi.org/10.1002/jobm.201900075>.
- [92] Khan, N. A. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS microbiology reviews* **30**, 564–595 (2006). URL <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x>.
- [93] Denet, E., Vasselon, V., Burdin, B., Nazaret, S. & Favre-Bonté, S. Survival and growth of *Stenotrophomonas maltophilia* in free-living amoebae (FLA) and bacterial virulence properties. *PloS one* **13**, e0192308 (2018). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192308>.
- [94] Loret, J.-F. & Greub, G. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *International journal of hygiene and environmental health* **213**, 167–175 (2010). URL <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.03.004>.
- [95] Fraud, S. & Poole, K. Oxidative stress induction of the mexxy multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**, 1068–1074 (2011). URL <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AAC.01495-10>. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/AAC.01495-10>.
- [96] Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Control of phagocytosis by microbial pathogens. *Frontiers in Immunology* **8** (2017). URL <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01368>.
- [97] Padan, E., Bibi, E., Ito, M. & Krulwich, T. A. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1717**, 67–88 (2005). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000573605002865>.

- [98] Schuldiner, S. *et al.* Induction of *sos* functions by alkaline intracellular pH in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **168**, 936–939 (1986). URL <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.168.2.936-939.1986>. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jb.168.2.936-939.1986>.
- [99] Taglicht, D., Padan, E., Oppenheim, A. B. & Schuldiner, S. An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**, 885–887 (1987). URL <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.169.2.885-887.1987>. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/jb.169.2.885-887.1987>.
- [100] Maurer, L. M., Yohannes, E., Bondurant, S. S., Radmacher, M. & Slonczewski, J. L. pH regulates genes for flagellar motility, catabolism, and oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **187**, 304 – 319 (2005). URL <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-11144263144&doi=10.1128%2fJB.187.1.304-319.2005&partnerID=40&md5=1ef8cdb59cd854124a3ca186bcd4f4a0>. Cited by: 338; All Open Access, Green Open Access.
- [101] Krulwich, T. A., Lewinson, O., Padan, E. & Bibi, E. Do physiological roles foster persistence of drug/multidrug-efflux transporters? a case study. *Nature Reviews Microbiology* **3**, 566–572 (2005).
- [102] Firman, J. *et al.* The impact of environmental pH on the gut microbiota community structure and short chain fatty acid production. *FEMS Microbiology Ecology* **98** (2022). URL <https://doi.org/10.1093/femsec/fiac038>. Fiac038, <https://academic.oup.com/femsec/article-pdf/98/5/fiac038/43708565/fiac038.pdf>.
- [103] Evans, D. F. *et al.* Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* **29**, 1035–1041 (1988). URL <https://gut.bmj.com/content/29/8/1035>. <https://gut.bmj.com/content/29/8/1035.full.pdf>.
- [104] Brune, A. & Köhl, M. pH profiles of the extremely alkaline hindguts of soil-feeding termites (isoptera: Termitidae) determined with microelectrodes. *Journal of Insect Physiology* **42**, 1121–1127 (1996). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191096000364>.
- [105] Lemke, T., Stingl, U., Egert, M., Friedrich, M. W. & Brune, A. Physicochemical conditions and microbial activities in the highly alkaline gut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 6650 – 6658 (2003). URL <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0242629019&doi=10.1128%2fAEM.69.11.6650-6658.2003&partnerID=40&md5=ede0369330e46b473097487b11256a70>. Cited by: 113; All Open Access, Green Open Access.
- [106] Martins, A. *et al.* pH modulation of efflux pump activity of multi-drug resistant *Escherichia coli*: Protection during its passage and eventual colonization of the colon.

- PLOS ONE* **4**, 1–9 (2009). URL <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006656>.
- [107] Amaral, L. *et al.* Ethidium bromide efflux by salmonella: modulation by metabolic energy, ph, ions and phenothiazines. *International Journal of Antimicrobial Agents* **38**, 140–145 (2011). URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857911001701>.
- [108] NOVÉ, M., KINCSES, A., MOLNÁR, J., AMARAL, L. & SPENGLER, G. The role of efflux pumps and environmental ph in bacterial multidrug resistance. *In Vivo* **34**, 65–71 (2020). URL <https://iv.iijournals.org/content/34/1/65>. <https://iv.iijournals.org/content/34/1/65.full.pdf>.
- [109] Pérez, A. *et al.* Involvement of the *acrAB-tolC* efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**, 2084–2090 (2012). URL <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AAC.05509-11>. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/AAC.05509-11>.
- [110] Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R. & Hanahan, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 4645–4649 (1990). URL <http://www.pnas.org/content/87/12/4645>. <https://www.pnas.org/content/87/12/4645.full.pdf>.
- [111] McGenity, T. J., Timmis, K. N. & Nogales, B. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Isolation and Cultivation* (Springer, 2017). URL <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-53118-1>.
- [112] Kolter, R., Inuzuka, M. & Helinski, D. R. Trans-complementation-dependent replication of a low molecular weight origin fragment from plasmid *r6k*. *Cell* **15**, 1199–1208 (1978). URL [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90046-6).
- [113] Martínez-García, E. & de Lorenzo, V. Engineering multiple genomic deletions in gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* **13**, 2702–2716 (2011). URL <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02538.x>.
- [114] Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805 (1994). URL <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.8303295>. <https://www.science.org/doi/pdf/10.1126/science.8303295>.
- [115] R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2020). URL <https://www.R-project.org/>.

- [116] Roscetto, E. *et al.* Functional characterization of the rna chaperone hfq in the opportunistic human pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Bacteriology* **194**, 5864–5874 (2012). URL <https://doi.org/10.1128/JB.00746-12>.
- [117] Denet, E., Coupat-Goutaland, B., Nazaret, S., Pélandakis, M. & Favre-Bonté, S. Diversity of free-living amoebae in soils and their associated human opportunistic bacteria. *Parasitology research* **116**, 3151–3162 (2017). URL <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5632-6>.
- [118] Denet, E., Triadou, S., Michalet, S., Nazaret, S. & Favre-Bonté, S. Growth of *Stenotrophomonas maltophilia* and expression of some efflux pumps encoding genes in the presence of supernatants from amoebal and bacterial co-cultures: towards the role of amoebal secondary metabolites. *Environmental Microbiology Reports* **12**, 702–711 (2020). URL <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1758-2229.12884>.

ANEXOS A

Biología molecular

Created with SnapGene®

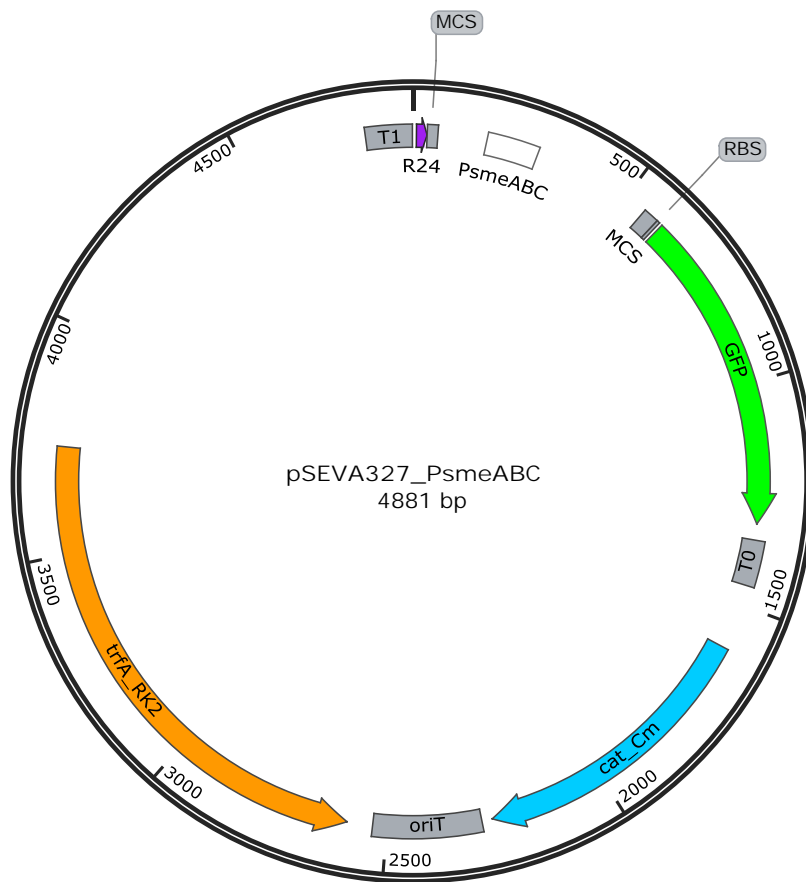


Figura A.1: Mapa genético del plásmido que contiene la fusión del promotor de SmeABC a gfp.

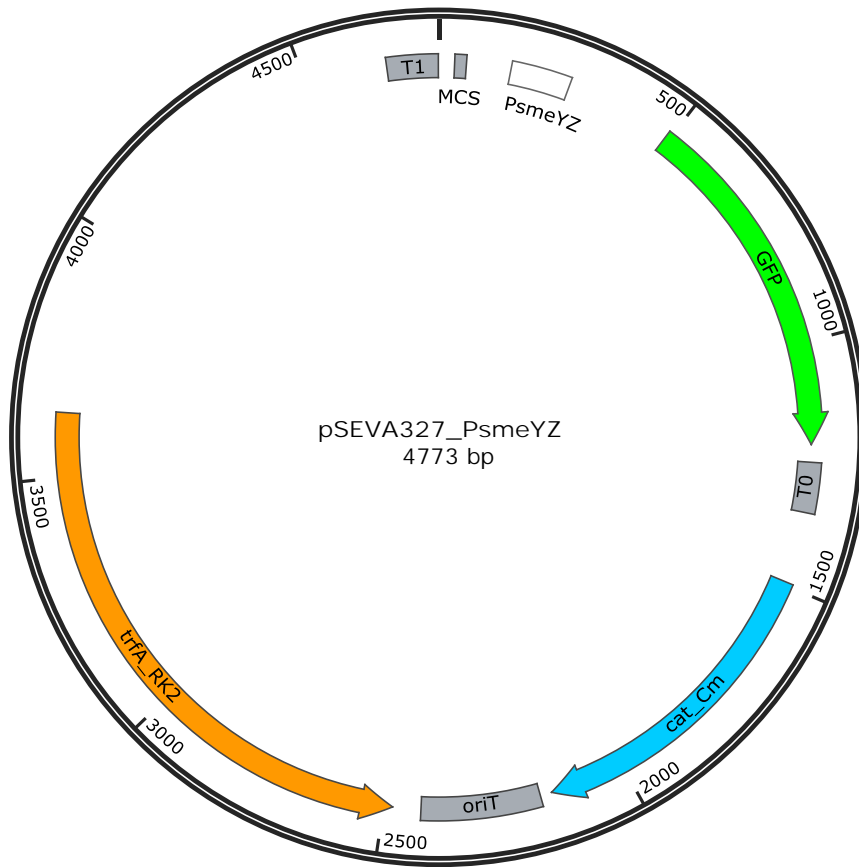


Figura A.2: Mapa genético del plásmido que contiene la fusión del promotor de SmeYZ a gfp.

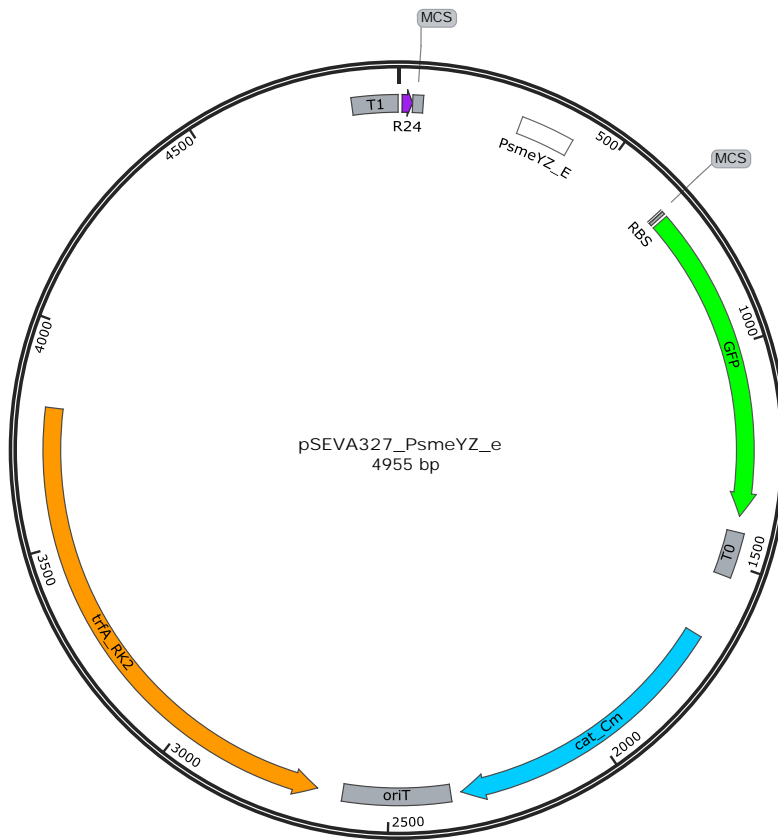


Figura A.3: Mapa genético del plásmido que contiene la fusión de la región promotora extendida de SmeYZ a gfp.

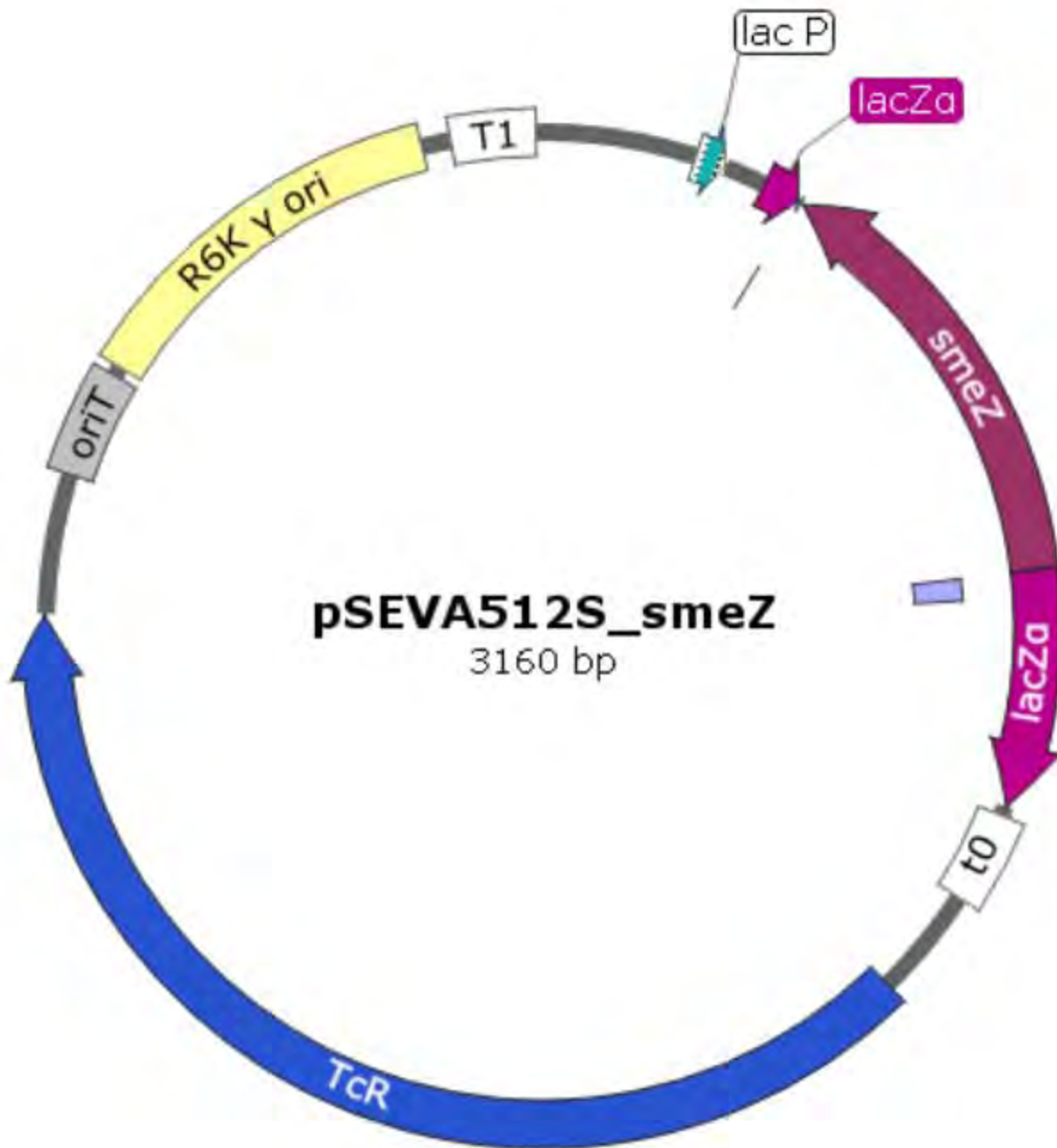


Figura A.4: Mapa genético del plásmido pSEVA512S implementado para la interrupción de *smeZ* mediante la estrategia de VIM.

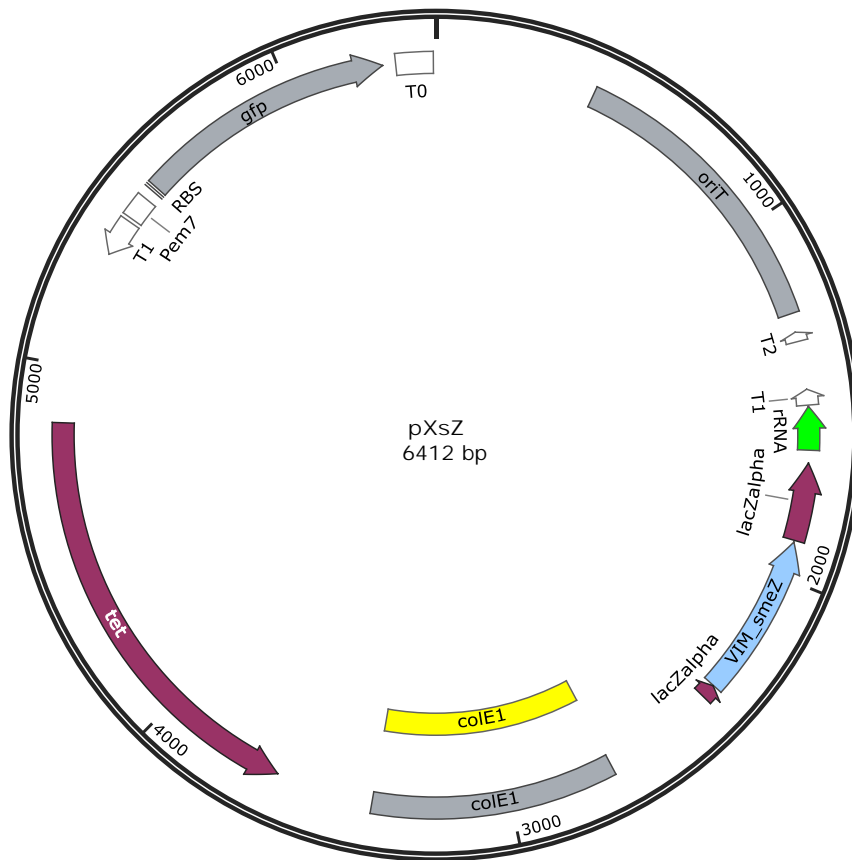


Figura A.5: Mapa genético del plásmido pEX18TcΔ*sacB*-*gfp* implementado para la interrupción de *smeZ* mediante la estrategia de VIM.

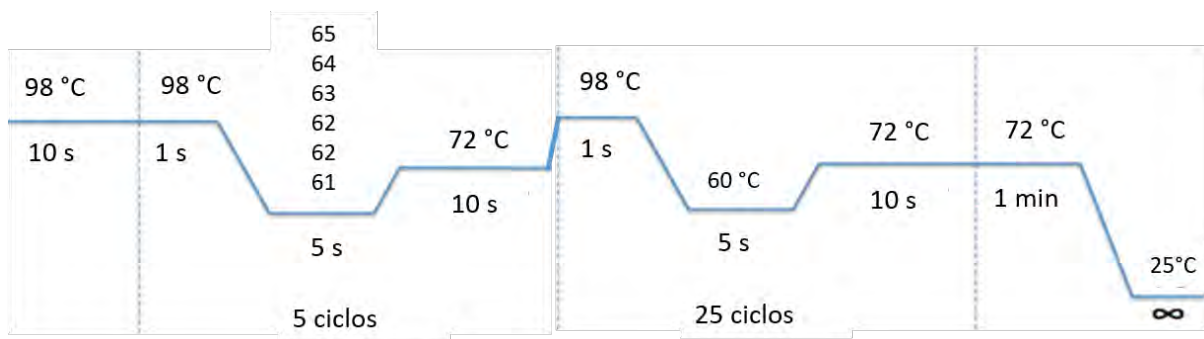
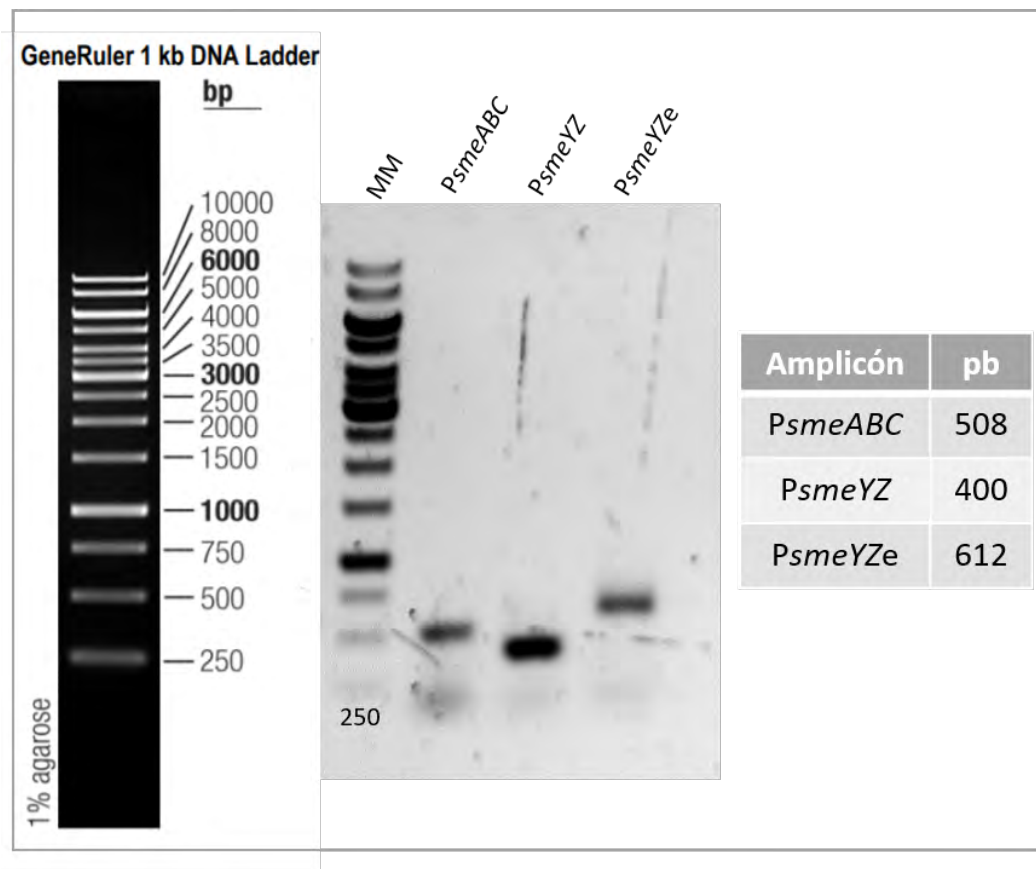


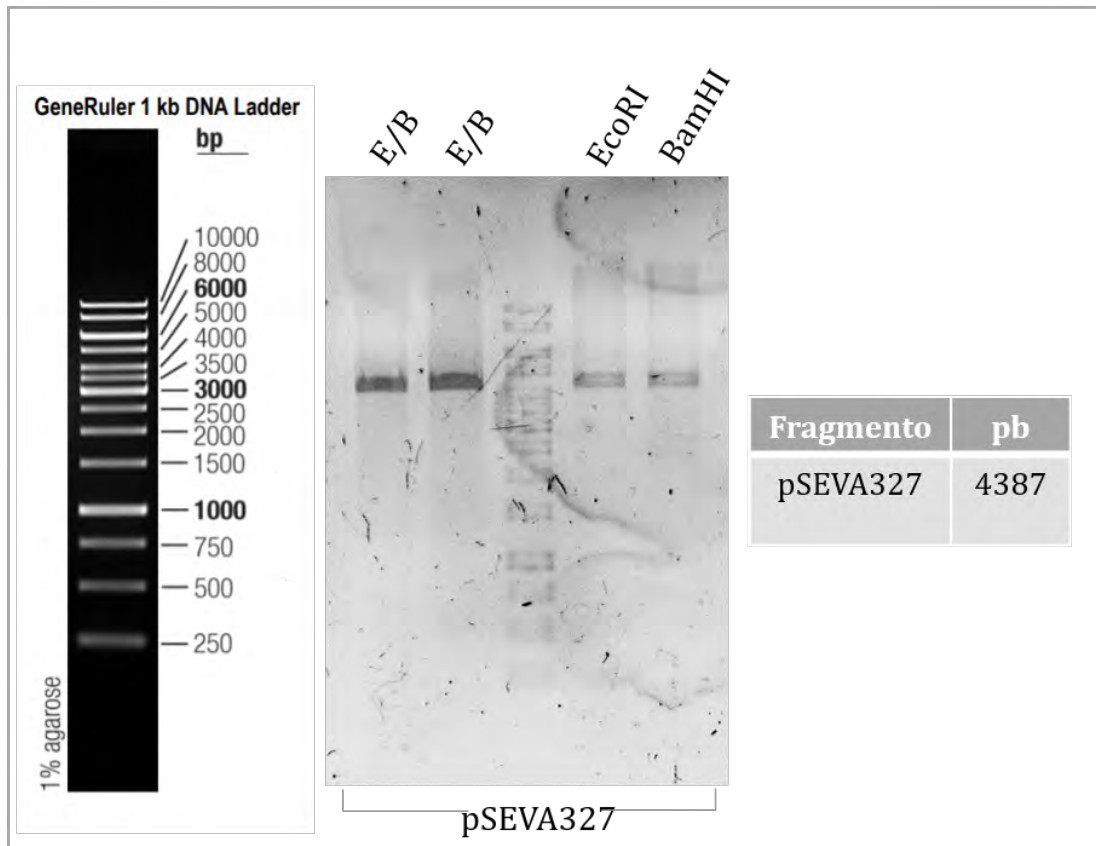
Figura A.6: Protocolo de TouchDown para amplificación de regiones promotoras: *SmeABC*, *SmeYZ* y *SmeYZe*.



Amplificación de regiones promotoras

Enzima: Phusion MMix Templado: DNAg Sm18
Purificados de banda con GeneJet PCR ThermoSci.

Figura A.7: Gel de agarosa de la amplificación por PCR de las regiones promotoras de interés con la enzima Phusion.



Digestión del vector

Enzimas: NEB 1 h, 37 °C
Buffer: CutSmart 1 µg de DNAP

Figura A.8: Gel de agarosa con los productos de la digestión del plásmido pSEVA327 con enzimas de restricción.

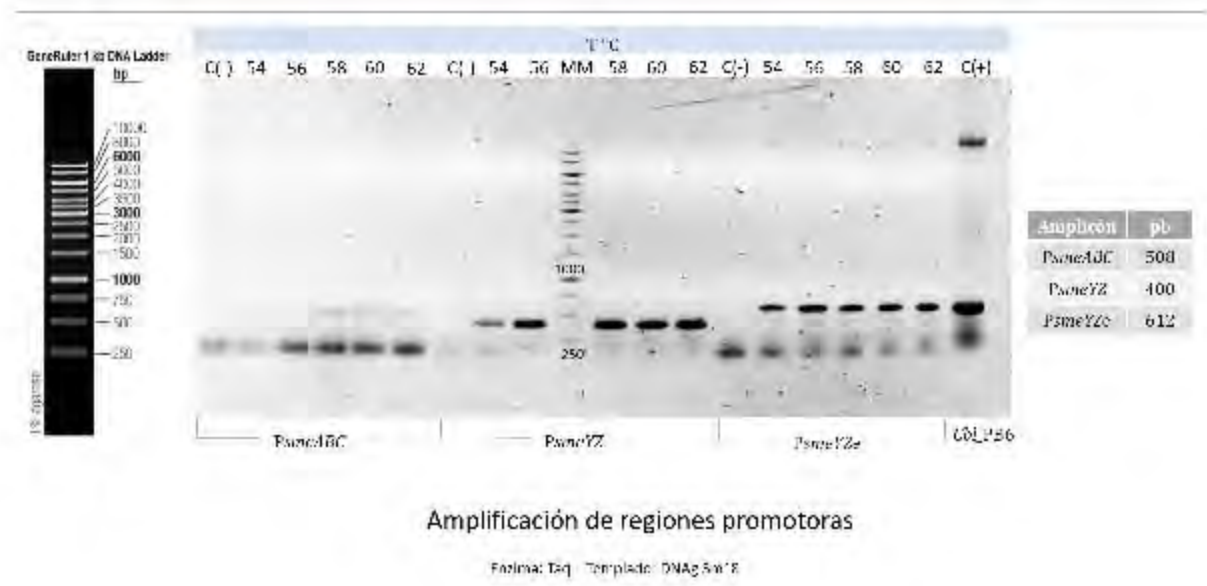


Figura A.9: Gel de agarosa del PCR de regiones promotoras de interés con la enzima Taq Polymerase. Se identificaron las temperaturas adecuadas para la amplificación. Este protocolo se estableció para realizar los PCRs de colonia.

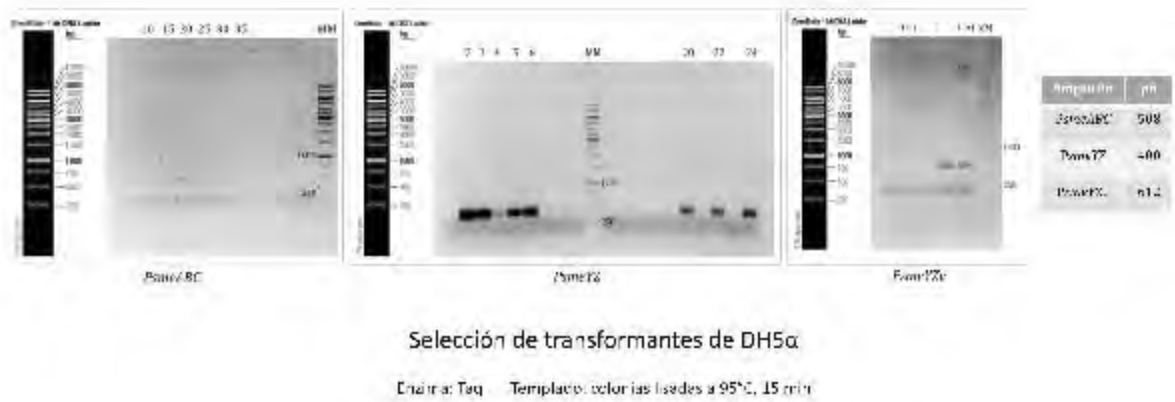
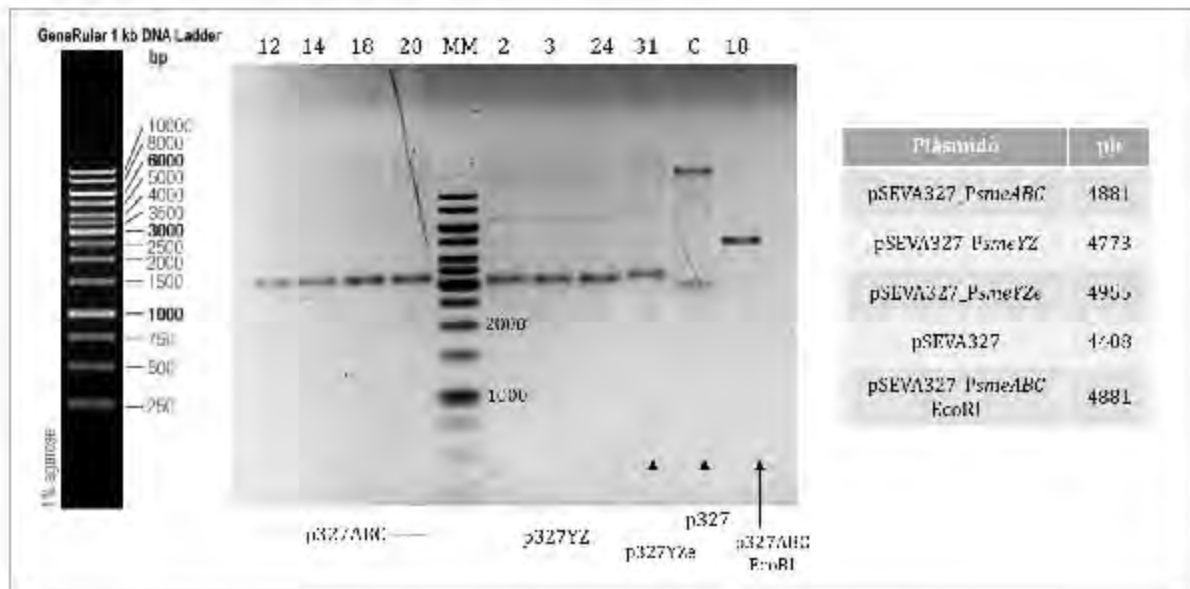


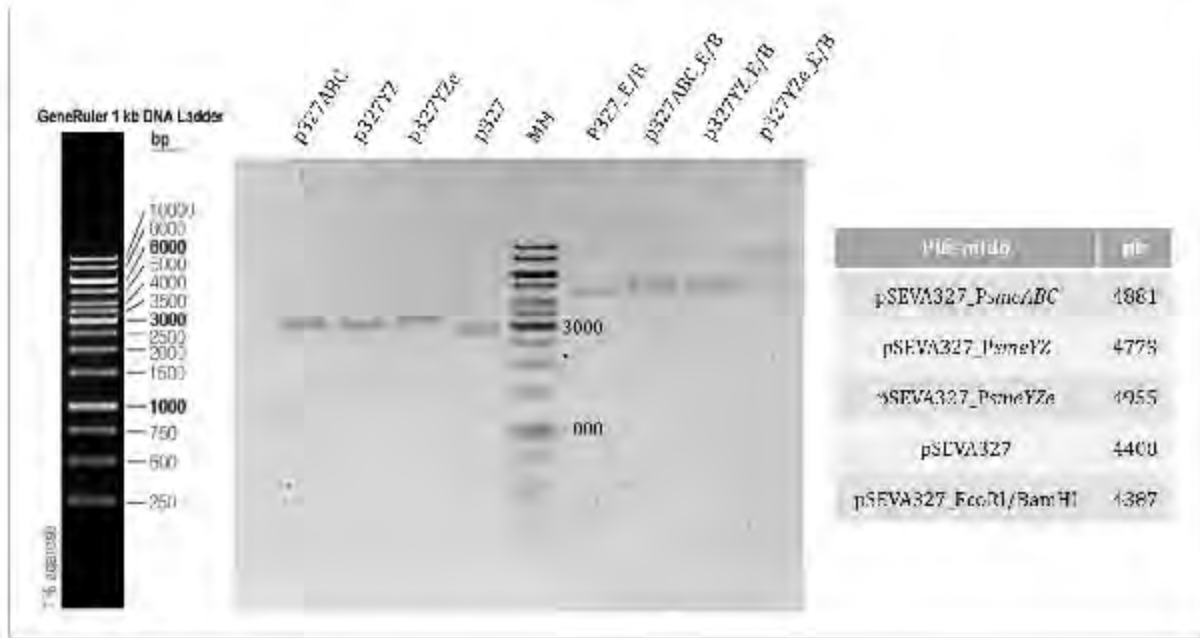
Figura A.10: Gel de agarosa del PCR de colonia para identificar transformantes de *E. coli* DH5α con los plásmidos que contienen las regiones promotoras de interés.



Perfil de plásmidos extraídos de colonias DH5α

^Vectores construidos a partir del pSEVA327

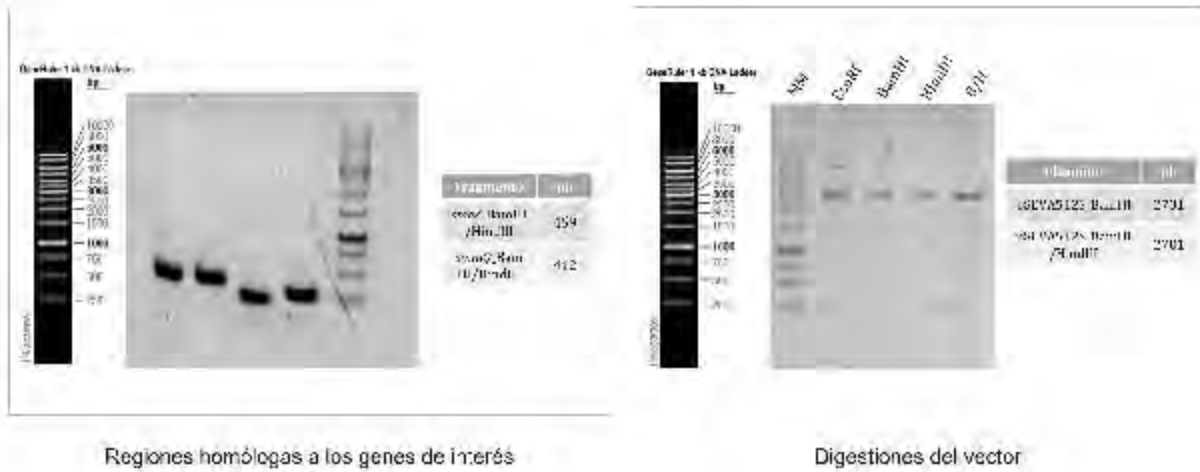
Figura A.11: Gel de agarosa con los plásmidos construidos y extraídos de colonias transformantes de *E.coli* DH5α.



Perfil de plásmidos extraídos de colonias Sm18

Derivados del pSEVA327, contienen regiones promotoras de interés río arriba de *gfp*

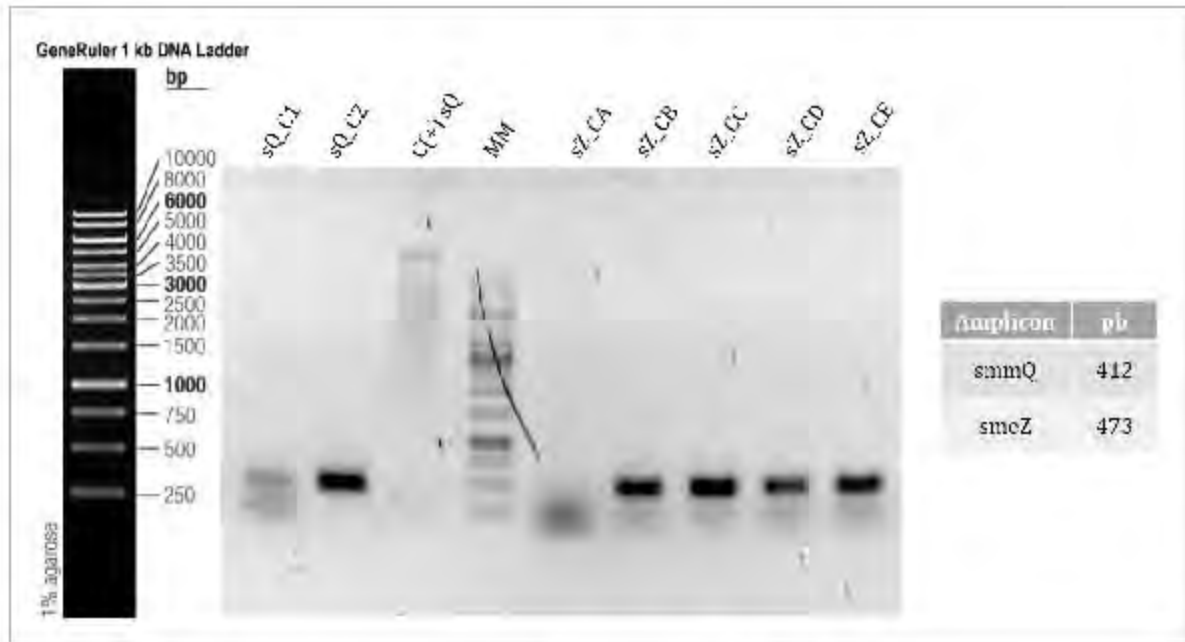
Figura A.12: Gel de agarosa con los plásmidos de interés extraídos de colonias transformantes de Sm18.



Regiones homólogas a los genes de interés

Digestiones del vector

Figura A.13: Geles de agarosa con amplicones de interés y digestiones del vector pSEVA512S para la estrategia de VIM. sZ, región interna del gen *smcZ*; sA, región interna de *smmA*; sC, región promotora de *smmC*; sQ región interna del gen *smmQ*.



Selección de transformantes de DH5 α λ pyr

Figura A.14: Geles de agarosa con PCR de colonia para seleccionar transformantes que posean el plásmido pSEVA512S de interés.

ANEXOS B

Ensayos de cocultivo

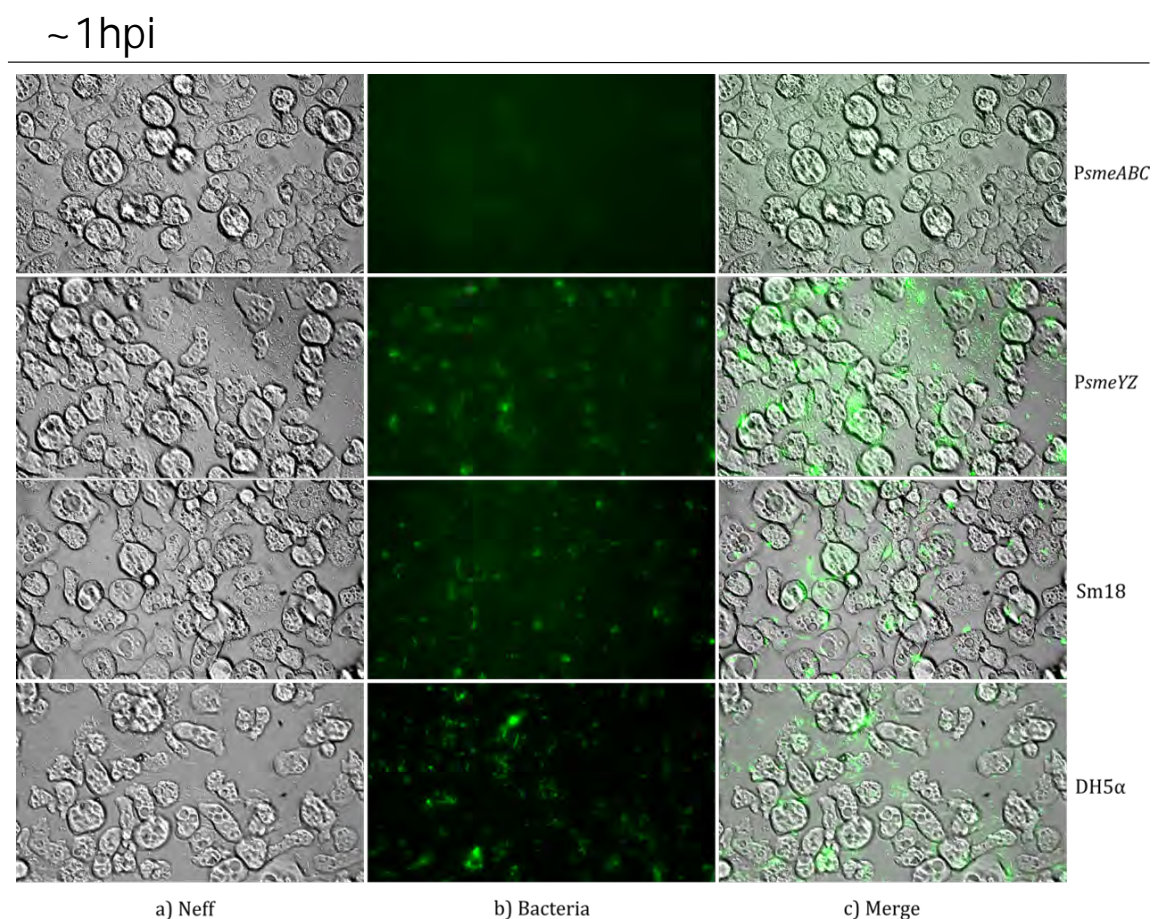


Figura B.1: Evaluación de la interacción de Sm18 y *E. coli* DH5 α con *A. castellanii* a 1 hpi, mediante epifluorescencia. a) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) donde se observan las amebas. b) Imagen de fluorescencia para identificar a la cepa mediante la expresión del reportero. c) Unión de canales: DIC+fluorescencia. Ensayo de co-cultivo observado a tiempos tempranos (1 hpi) usando una MOI= 20:1, objetivo 63X. *PsmABC*, Sm18/p327ABC; *PsmYZ*, Sm18/p327YZ; Sm18, Sm18/p537; DH5 α , *E. coli* DH5 α ::p537.

72hpi

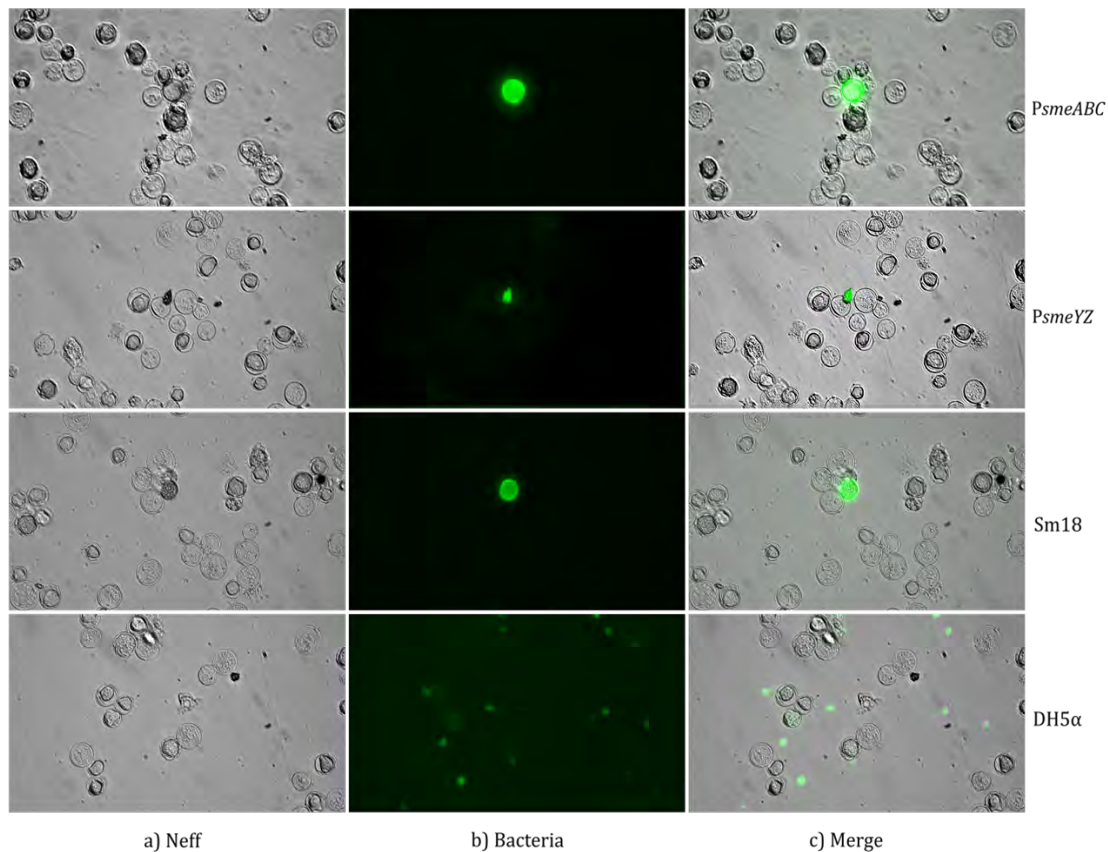


Figura B.2: Evaluación de la interacción de Sm18 y *E. coli* DH5α con *A. castellanii* a 72 hpi, mediante epifluorescencia. a) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) donde se observan las amebas. b) Imagen de fluorescencia para identificar a la cepa mediante la expresión del reportero. c) Unión de canales: DIC+fluorescencia. Ensayo de co-cultivo observado a tiempos tardíos (72 hpi) usando una MOI= 20:1, objetivo 63X. *PsmABC*, Sm18/p327ABC; *PsmYZ*, Sm18/p327YZ; Sm18, Sm18/p537; DH5α, *E.coli* DH5α::p537.

96hpi

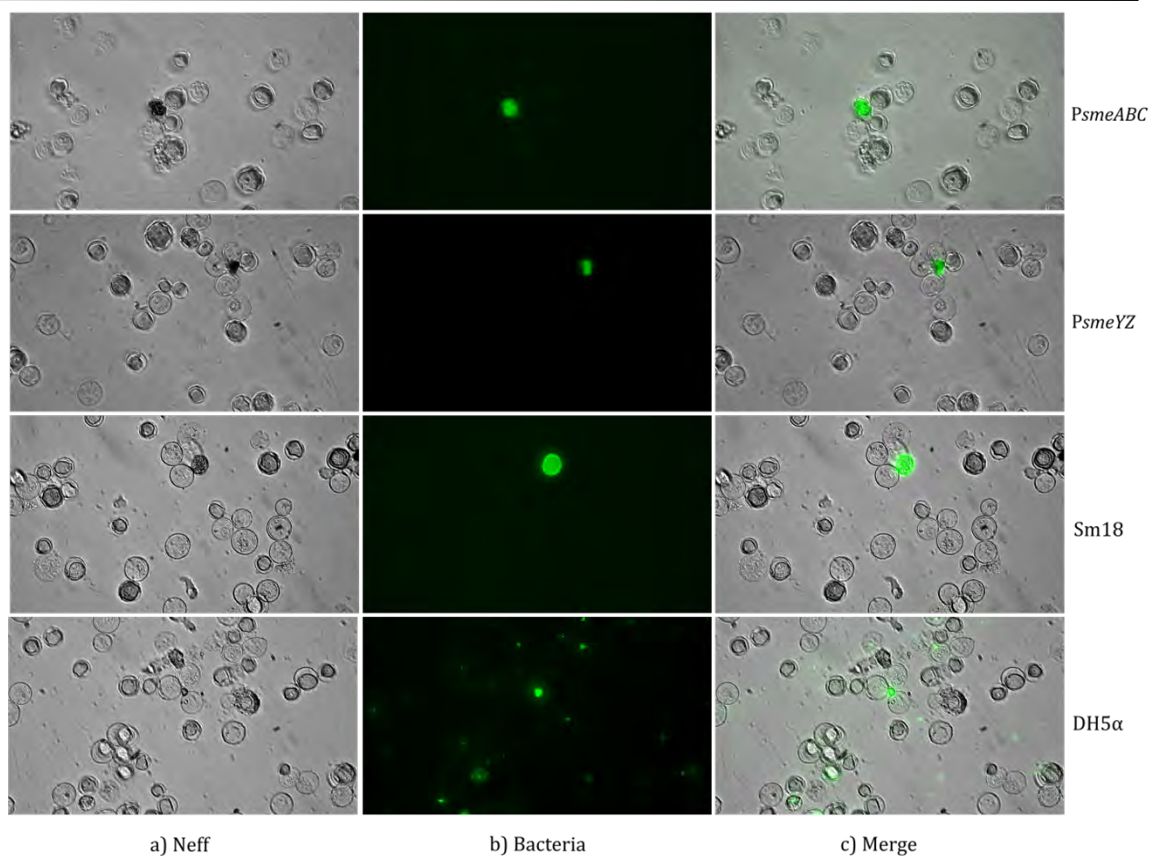


Figura B.3: Evaluación de la interacción de Sm18 y *E. coli* DH5 α con *A. castellanii* a 96 hpi, mediante epifluorescencia. a) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) donde se observan las amebas. b) Imagen de fluorescencia para identificar a la cepa mediante la expresión del reportero. c) Unión de canales: DIC+fluorescencia. Ensayo de co-cultivo observado a tiempos tardíos (96 hpi) usando una MOI= 20:1, objetivo 63X. *PsmeABC*, Sm18/p327ABC; *PsmeYZ*, Sm18/p327YZ; Sm18, Sm18/p537; DH5 α , *E. coli* DH5 α ::p537.

~1 hpi

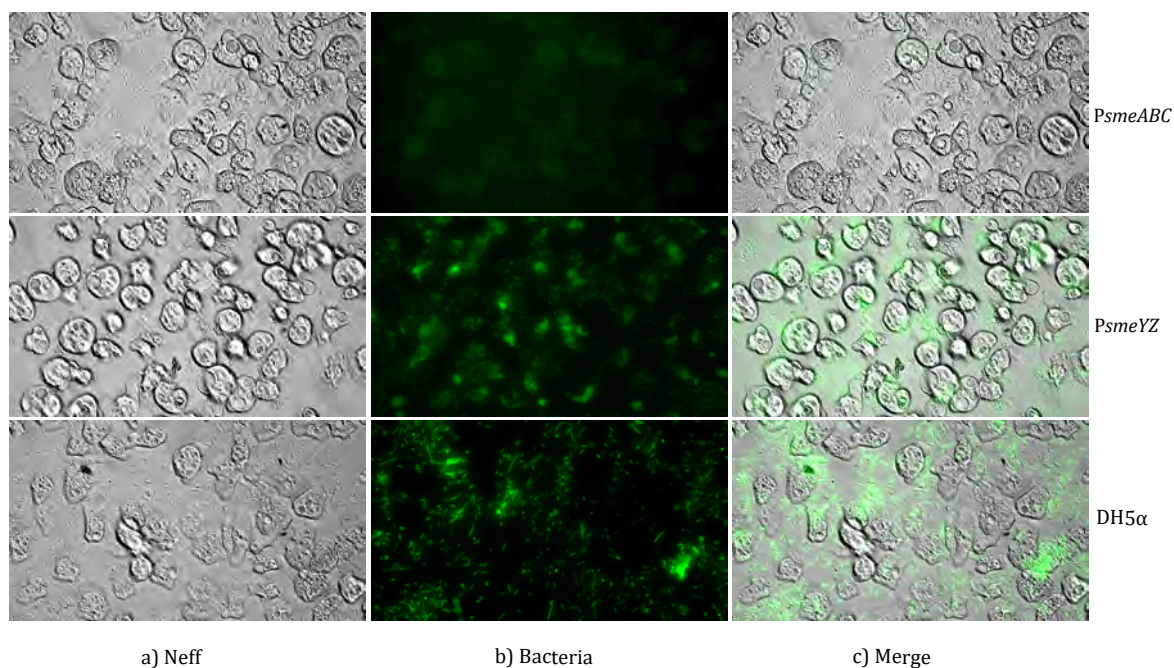


Figura B.4: Evaluación de la expresión de bombas de eflujo mediante epifluorescencia durante la interacción de Sm18 y *E. coli* DH5α con *A. castellanii* a 1 hpi. a) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) donde se observan las amebas. b) Imagen de fluorescencia para identificar a la cepa mediante la expresión del reportero. c) Unión de canales: DIC+fluorescencia. Ensayo de co-cultivo observado a tiempos tempranos (1 hpi) usando una MOI= 50:1, objetivo 63X. *PsmABC*, Sm18/p327ABC; *PsmYZ*, Sm18/p327YZ; DH5α, *E.coli* DH5α::p537.

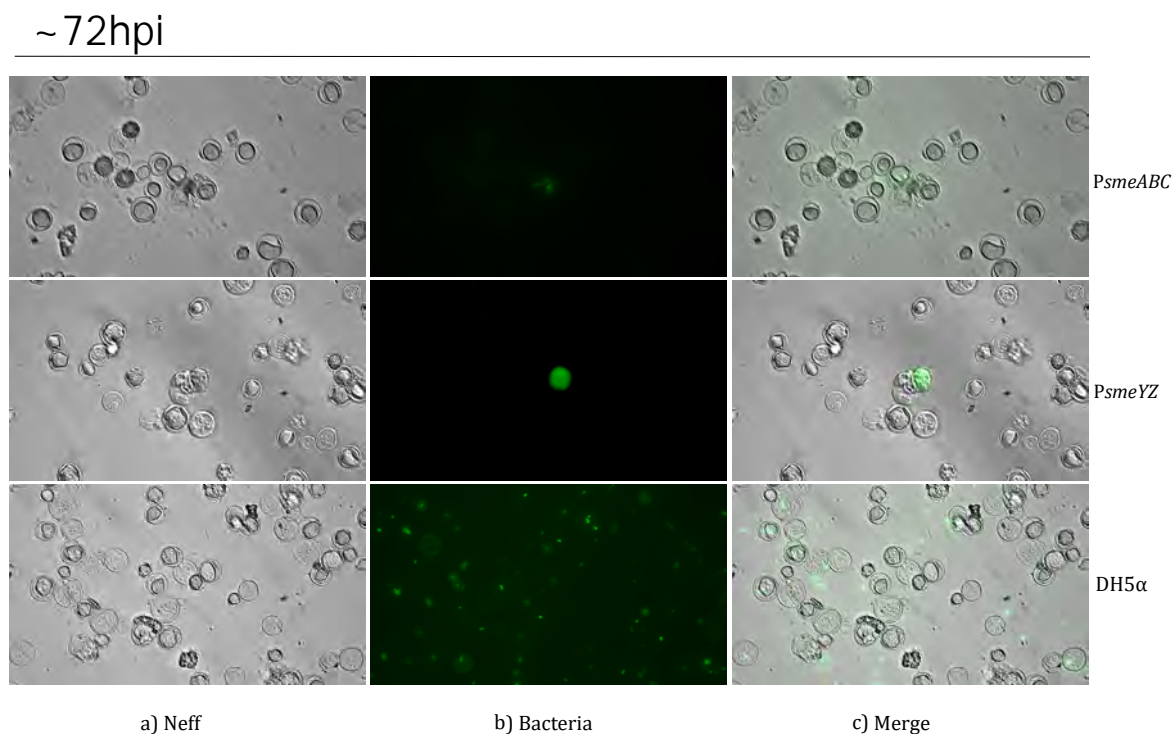


Figura B.5: Evaluación de la expresión de bombas de eflujo mediante epifluorescencia durante la interacción de Sm18 y *E. coli* DH5α con *A. castellanii* a 72 hpi. a) Imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) donde se observan las amebas. b) Imagen de fluorescencia para identificar a la cepa mediante la expresión del reportero. c) Unión de canales: DIC+fluorescencia. Ensayo de co-cultivo observado a tiempos tempranos (1 hpi) usando una MOI= 50:1, objetivo 63X. *PsmABC*, Sm18/p327ABC; *PsmYZ*, Sm18/p327YZ; DH5α, *E. coli* DH5α::p537.

ANEXOS C

Análisis estadístico

Se realizaron las pruebas de ANOVA unidireccional y de Tukey en R.

```

> summary(aov.out)
          Df Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
strain     5 48987485 9797497   166.5 1.19e-10 ***
Residuals 12  706321    58860
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
> #TukeyHSD(aov.out)
>
> #summary.lm(aov.out)
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
          diff          lwr          upr          p adj
ABC.37-ABC.30  257.3333 -408.0389  922.70558 0.7803825
YZ.30-ABC.30  4282.0000 3616.6278 4947.37225 0.0000000
YZ.37-ABC.30  3685.6667 3020.2944 4351.03891 0.0000000
Yze.30-ABC.30 3058.0000 2392.6278 3723.37225 0.0000000
Yze.37-ABC.30 2994.0000 2328.6278 3659.37225 0.0000000
YZ.30-ABC.37  4024.6667 3359.2944 4690.03891 0.0000000
YZ.37-ABC.37  3428.3333 2762.9611 4093.70558 0.0000000
Yze.30-ABC.37 2800.6667 2135.2944 3466.03891 0.0000001
Yze.37-ABC.37 2736.6667 2071.2944 3402.03891 0.0000001
YZ.37-YZ.30   -596.3333 -1261.7056   69.03891 0.0890313
Yze.30-YZ.30 -1224.0000 -1889.3722 -558.62775 0.0005222
Yze.37-YZ.30 -1288.0000 -1953.3722 -622.62775 0.0003262
Yze.30-YZ.37  -627.6667 -1293.0389   37.70558 0.0686512
Yze.37-YZ.37  -691.6667 -1357.0389  -26.29442 0.0400091
Yze.37-Yze.30  -64.0000  -729.3722  601.37225 0.9993973

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.30  YZ.37  Yze.30  Yze.37  ABC.37  ABC.30
    "a"   "ab"   "bc"   "c"    "d"    "d"

```

Figura C.1: Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de imipenem en el medio de cultivo a las 24h.

```

> summary(aov.out)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
strain    5 33191696 6638339   91.77 3.89e-09 ***
Residuals 12  868088    72341
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
      diff      lwr      upr    p adj
ABC.37-ABC.30  300.0000 -437.6416 1037.64159 0.7451536
YZ.30-ABC.30  3644.6667 2907.0251 4382.30826 0.0000000
YZ.37-ABC.30  3124.0000 2386.3584 3861.64159 0.0000001
Yze.30-ABC.30 2485.6667 1748.0251 3223.30826 0.0000011
Yze.37-ABC.30 2017.3333 1279.6917 2754.97493 0.0000104
YZ.30-ABC.37  3344.6667 2607.0251 4082.30826 0.0000000
YZ.37-ABC.37  2824.0000 2086.3584 3561.64159 0.0000003
Yze.30-ABC.37 2185.6667 1448.0251 2923.30826 0.0000044
Yze.37-ABC.37 1717.3333  979.6917 2454.97493 0.0000544
YZ.37-YZ.30   -520.6667 -1258.3083  216.97493 0.2398918
Yze.30-YZ.30 -1159.0000 -1896.6416 -421.35841 0.0020755
Yze.37-YZ.30 -1627.3333 -2364.9749 -889.69174 0.0000929
Yze.30-YZ.37  -638.3333 -1375.9749  99.30826 0.1053278
Yze.37-YZ.37 -1106.6667 -1844.3083 -369.02507 0.0030365
Yze.37-Yze.30 -468.3333 -1205.9749  269.30826 0.3336320

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.30  YZ.37  Yze.30  Yze.37  ABC.37  ABC.30
    "a"   "ab"   "bc"   "c"    "d"    "d"

```

Figura C.2: Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de imipenem en el medio de cultivo a las 48h.


```

> summary(aov.out)
          Df      Sum Sq  Mean Sq F value    Pr(>F)
strain     5 236595774 47319155   154.3 1.85e-10 ***
Residuals  12   3679282   306607
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
      diff      lwr      upr    p adj
ABC.37-ABC.30  355.0000 -1163.606  1873.606 0.9649077
YZ.30-ABC.30 10095.3333  8576.728 11613.939 0.0000000
YZ.37-ABC.30  3309.0000  1790.394  4827.606 0.0001049
Yze.30-ABC.30 7424.6667  5906.061  8943.272 0.0000000
Yze.37-ABC.30 3461.6667  1943.061  4980.272 0.0000672
YZ.30-ABC.37  9740.3333  8221.728 11258.939 0.0000000
YZ.37-ABC.37  2954.0000  1435.394  4472.606 0.0003117
Yze.30-ABC.37 7069.6667  5551.061  8588.272 0.0000000
Yze.37-ABC.37 3106.6667  1588.061  4625.272 0.0001934
YZ.37-YZ.30  -6786.3333 -8304.939 -5267.728 0.0000000
Yze.30-YZ.30  -2670.6667 -4189.272 -1152.061 0.0007837
Yze.37-YZ.30  -6633.6667 -8152.272 -5115.061 0.0000001
Yze.30-YZ.37  4115.6667  2597.061  5634.272 0.0000114
Yze.37-YZ.37   152.6667 -1365.939  1671.272 0.9992539
Yze.37-Yze.30 -3963.0000 -5481.606 -2444.394 0.0000169

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.30 Yze.30 Yze.37  YZ.37 ABC.37 ABC.30
    "a"    "b"    "c"    "c"    "d"    "d"

```

Figura C.3: Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de tetraciclina en el medio de cultivo a las 24h.

```

> summary(aov.out)
              Df      Sum Sq  Mean Sq F value   Pr(>F)
strain         5 128157215 25631443   86.25 5.58e-09 ***
Residuals     12   3566311    297193
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
      diff      lwr      upr    p adj
ABC.37-ABC.30  729.3333 -765.7765 2224.4432 0.5912961
YZ.30-ABC.30  6298.3333 4803.2235 7793.4432 0.0000001
YZ.37-ABC.30  7015.6667 5520.5568 8510.7765 0.0000000
Yze.30-ABC.30 4537.6667 3042.5568 6032.7765 0.0000034
Yze.37-ABC.30 5169.0000 3673.8901 6664.1099 0.0000008
YZ.30-ABC.37  5569.0000 4073.8901 7064.1099 0.0000004
YZ.37-ABC.37  6286.3333 4791.2235 7781.4432 0.0000001
Yze.30-ABC.37 3808.3333 2313.2235 5303.4432 0.0000218
Yze.37-ABC.37 4439.6667 2944.5568 5934.7765 0.0000043
YZ.37-YZ.30    717.3333 -777.7765 2212.4432 0.6067877
Yze.30-YZ.30 -1760.6667 -3255.7765 -265.5568 0.0182778
Yze.37-YZ.30 -1129.3333 -2624.4432  365.7765 0.1877089
Yze.30-YZ.37 -2478.0000 -3973.1099 -982.8901 0.0013186
Yze.37-YZ.37 -1846.6667 -3341.7765 -351.5568 0.0131977
Yze.37-Yze.30   631.3333 -863.7765 2126.4432 0.7166204

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.37  YZ.30  Yze.37  Yze.30  ABC.37  ABC.30
    "a"   "ab"   "bc"   "c"    "d"    "d"

```

Figura C.4: Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de tetraciclina en el medio de cultivo a las 48h.

```

> summary(aov.out)
              Df  Sum Sq Mean Sq F value    Pr(>F)
strain         5 40156504 8031301    56.4 6.43e-08 ***
Residuals     12  1708813  142401
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
      diff      lwr      upr    p adj
ABC.37-ABC.30  -31.0000 -1065.9295  1003.9295 0.9999981
YZ.30-ABC.30  4242.6667  3207.7372  5277.5961 0.0000001
YZ.37-ABC.30  1509.6667   474.7372  2544.5961 0.0038054
Yze.30-ABC.30 2680.3333  1645.4039  3715.2628 0.0000183
Yze.37-ABC.30 1895.6667   860.7372  2930.5961 0.0005431
YZ.30-ABC.37  4273.6667  3238.7372  5308.5961 0.0000001
YZ.37-ABC.37  1540.6667   505.7372  2575.5961 0.0032334
Yze.30-ABC.37 2711.3333  1676.4039  3746.2628 0.0000163
Yze.37-ABC.37 1926.6667   891.7372  2961.5961 0.0004683
YZ.37-YZ.30   -2733.0000 -3767.9295 -1698.0705 0.0000150
Yze.30-YZ.30  -1562.3333 -2597.2628  -527.4039 0.0028873
Yze.37-YZ.30  -2347.0000 -3381.9295 -1312.0705 0.0000707
Yze.30-YZ.37  1170.6667   135.7372  2205.5961 0.0237933
Yze.37-YZ.37   386.0000  -648.9295  1420.9295 0.8036235
Yze.37-Yze.30  -784.6667 -1819.5961   250.2628 0.1850335

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.30 Yze.30 Yze.37  YZ.37 ABC.30 ABC.37
    "a"   "b"   "bc"   "c"   "d"   "d"

```

Figura C.5: Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de kanamicina en el medio de cultivo a las 24h.

```

> summary(aov.out)
              Df  Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
strain         5 27078550 5415710   20.11 1.87e-05 ***
Residuals     12  3232423  269369
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
              diff          lwr          upr          p adj
ABC.37-ABC.30 -282.0000 -1705.4022  1141.4022  0.9826419
YZ.30-ABC.30  3300.3333  1876.9311  4723.7355  0.0000567
YZ.37-ABC.30  1022.0000  -401.4022  2445.4022  0.2261130
Yze.30-ABC.30  2028.3333   604.9311  3451.7355  0.0045768
Yze.37-ABC.30  1774.0000   350.5978  3197.4022  0.0123910
YZ.30-ABC.37  3582.3333  2158.9311  5005.7355  0.0000246
YZ.37-ABC.37  1304.0000  -119.4022  2727.4022  0.0798176
Yze.30-ABC.37  2310.3333   886.9311  3733.7355  0.0015777
Yze.37-ABC.37  2056.0000   632.5978  3479.4022  0.0041143
YZ.37-YZ.30   -2278.3333 -3701.7355  -854.9311  0.0017760
Yze.30-YZ.30  -1272.0000 -2695.4022   151.4022  0.0903110
Yze.37-YZ.30  -1526.3333 -2949.7355  -102.9311  0.0332281
Yze.30-YZ.37   1006.3333  -417.0689  2429.7355  0.2385726
Yze.37-YZ.37    752.0000  -671.4022  2175.4022  0.5141901
Yze.37-Yze.30  -254.3333 -1677.7355  1169.0689  0.9890002

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.30 Yze.30 Yze.37  YZ.37 ABC.30 ABC.37
    "a"  "ab"  "b"  "bc"  "c"  "c"

```

Figura C.6: Expresión de SmeABC y SmeYZ en presencia de kanamicina en el medio de cultivo a las 48h.


```

> summary(aov.out)
      Df  Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
strain  5 36873919 7374784  205.7 3.4e-11 ***
Residuals 12  430295   35858
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
      diff      lwr      upr      p adj
ABC.37-ABC.30 -233.0000 -752.3341  286.334098 0.6667787
YZ.30-ABC.30  3867.6667  3348.3326 4387.000765 0.0000000
YZ.37-ABC.30  2194.0000  1674.6659 2713.334098 0.0000001
Yze.30-ABC.30  2503.3333  1983.9992 3022.667431 0.0000000
Yze.37-ABC.30  1980.6667  1461.3326 2500.000765 0.0000003
YZ.30-ABC.37  4100.6667  3581.3326 4620.000765 0.0000000
YZ.37-ABC.37  2427.0000  1907.6659 2946.334098 0.0000000
Yze.30-ABC.37  2736.3333  2216.9992 3255.667431 0.0000000
Yze.37-ABC.37  2213.6667  1694.3326 2733.000765 0.0000001
YZ.37-YZ.30  -1673.6667 -2193.0008 -1154.332569 0.0000018
Yze.30-YZ.30  -1364.3333 -1883.6674  -844.999235 0.0000158
Yze.37-YZ.30  -1887.0000 -2406.3341 -1367.665902 0.0000005
Yze.30-YZ.37   309.3333  -210.0008  828.667431 0.3951512
Yze.37-YZ.37  -213.3333  -732.6674  306.000765 0.7377509
Yze.37-Yze.30  -522.6667 -1042.0008  -3.332569 0.0482265

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
YZ.30 Yze.30 YZ.37 Yze.37 ABC.30 ABC.37
  "a"  "b"  "bc"  "c"  "d"  "d"

```

Figura C.7: Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH ácido a las 24h.

```

> summary(aov.out)
          Df   Sum Sq Mean Sq F value   Pr(>F)
strain     5 20959084 4191817   50.51 1.2e-07 ***
Residuals  12   995904    82992
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
      diff      lwr      upr    p adj
ABC.37-ABC.30 -453.0000 -1243.0822  337.0822 0.4328433
YZ.30-ABC.30  2765.6667  1975.5845 3555.7488 0.0000007
YZ.37-ABC.30  1576.6667   786.5845 2366.7488 0.0002450
Yze.30-ABC.30 1694.6667   904.5845 2484.7488 0.0001224
Yze.37-ABC.30 1230.0000   439.9178 2020.0822 0.0022413
YZ.30-ABC.37  3218.6667  2428.5845 4008.7488 0.0000001
YZ.37-ABC.37  2029.6667  1239.5845 2819.7488 0.0000199
Yze.30-ABC.37 2147.6667  1357.5845 2937.7488 0.0000111
Yze.37-ABC.37 1683.0000   892.9178 2473.0822 0.0001309
YZ.37-YZ.30  -1189.0000 -1979.0822 -398.9178 0.0029615
Yze.30-YZ.30 -1071.0000 -1861.0822 -280.9178 0.0067176
Yze.37-YZ.30 -1535.6667 -2325.7488 -745.5845 0.0003140
Yze.30-YZ.37   118.0000  -672.0822  908.0822 0.9951361
Yze.37-YZ.37  -346.6667 -1136.7488  443.4155 0.6856065
Yze.37-Yze.30 -464.6667 -1254.7488  325.4155 0.4076455

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.30 Yze.30  YZ.37 Yze.37 ABC.30 ABC.37
    "a"  "b"   "b"   "b"   "c"   "c"

```

Figura C.8: Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH ácido a las 48h.


```

> summary(aov.out)
          Df  Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
strain     5 18106976 3621395  10.11 0.000559 ***
Residuals 12  4299492  358291
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
      diff      lwr      upr    p adj
ABC.37-ABC.30 -22.0000 -1663.6180 1619.6180 1.0000000
YZ.30-ABC.30  2695.6667  1054.0487 4337.2846 0.0014283
YZ.37-ABC.30  1508.3333  -133.2846 3149.9513 0.0786400
Yze.30-ABC.30  2083.6667   442.0487 3725.2846 0.0108868
Yze.37-ABC.30  1188.0000  -453.6180 2829.6180 0.2198924
YZ.30-ABC.37  2717.6667  1076.0487 4359.2846 0.0013319
YZ.37-ABC.37  1530.3333  -111.2846 3171.9513 0.0730221
Yze.30-ABC.37  2105.6667   464.0487 3747.2846 0.0100964
Yze.37-ABC.37  1210.0000  -431.6180 2851.6180 0.2057611
YZ.37-YZ.30   -1187.3333 -2828.9513  454.2846 0.2203326
Yze.30-YZ.30   -612.0000 -2253.6180 1029.6180 0.8039029
Yze.37-YZ.30  -1507.6667 -3149.2846  133.9513 0.0788165
Yze.30-YZ.37    575.3333 -1066.2846 2216.9513 0.8392828
Yze.37-YZ.37   -320.3333 -1961.9513 1321.2846 0.9837557
Yze.37-Yze.30  -895.6667 -2537.2846  745.9513 0.4822628

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.30 Yze.30 YZ.37 Yze.37 ABC.30 ABC.37
    "a"   "a"  "ab"  "ab"   "b"   "b"

```

Figura C.9: Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH neutro a las 24h.

```

> summary(aov.out)
          Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
strain     5 6899966 1379993   3.855 0.0258 *
Residuals 12 4296247   358021
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
      diff      lwr      upr    p adj
ABC.37-ABC.30 -390.3333 -2031.3316 1250.6649 0.9623012
YZ.30-ABC.30  1538.3333  -102.6649 3179.3316 0.0709358
YZ.37-ABC.30   676.0000  -964.9983 2316.9983 0.7356324
Yze.30-ABC.30  874.6667  -766.3316 2515.6649 0.5054405
Yze.37-ABC.30  677.0000  -963.9983 2317.9983 0.7345194
YZ.30-ABC.37  1928.6667   287.6684 3569.6649 0.0185194
YZ.37-ABC.37  1066.3333  -574.6649 2707.3316 0.3120536
Yze.30-ABC.37 1265.0000  -375.9983 2905.9983 0.1734413
Yze.37-ABC.37 1067.3333  -573.6649 2708.3316 0.3111924
YZ.37-YZ.30   -862.3333 -2503.3316  778.6649 0.5194647
Yze.30-YZ.30  -663.6667 -2304.6649  977.3316 0.7492502
Yze.37-YZ.30  -861.3333 -2502.3316  779.6649 0.5206074
Yze.30-YZ.37   198.6667 -1442.3316 1839.6649 0.9981831
Yze.37-YZ.37    1.0000 -1639.9983 1641.9983 1.0000000
Yze.37-Yze.30 -197.6667 -1838.6649 1443.3316 0.9982262

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.30 Yze.30 Yze.37  YZ.37 ABC.30 ABC.37
    "a"  "ab"  "ab"  "ab"  "ab"  "b"

```

Figura C.10: Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH neutro a las 48h.


```

> summary(aov.out)
          Df  Sum Sq Mean Sq F value  Pr(>F)
strain     5 28800330 5760066   51.23 1.11e-07 ***
Residuals 12 1349346 112445
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
  Tukey multiple comparisons of means
    95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
          diff          lwr          upr          p adj
ABC.37-ABC.30 -109.6667 -1029.3222  809.9889 0.9983091
YZ.30-ABC.30  3435.0000  2515.3445 4354.6555 0.0000004
YZ.37-ABC.30  2114.3333  1194.6778 3033.9889 0.0000617
Yze.30-ABC.30  2235.3333  1315.6778 3154.9889 0.0000352
Yze.37-ABC.30  1886.3333   966.6778 2805.9889 0.0001886
YZ.30-ABC.37  3544.6667  2625.0111 4464.3222 0.0000002
YZ.37-ABC.37  2224.0000  1304.3445 3143.6555 0.0000370
Yze.30-ABC.37  2345.0000  1425.3445 3264.6555 0.0000215
Yze.37-ABC.37  1996.0000  1076.3445 2915.6555 0.0001091
YZ.37-YZ.30   -1320.6667 -2240.3222 -401.0111 0.0043075
Yze.30-YZ.30  -1199.6667 -2119.3222 -280.0111 0.0089341
Yze.37-YZ.30  -1548.6667 -2468.3222 -629.0111 0.0011488
Yze.30-YZ.37   121.0000  -798.6555 1040.6555 0.9973074
Yze.37-YZ.37  -228.0000 -1147.6555  691.6555 0.9553674
Yze.37-Yze.30 -349.0000 -1268.6555  570.6555 0.7927521

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
  YZ.30 Yze.30  YZ.37 Yze.37 ABC.30 ABC.37
    "a"  "b"  "b"  "b"  "c"  "c"

```

Figura C.11: Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH alcalino a las 24h.

```

> summary(aov.out)
          Df  Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
strain     5 25472921 5094584  45.38 2.2e-07 ***
Residuals 12  1347091  112258
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
>
>
> tukey <- TukeyHSD(aov.out)
> print(tukey)
Tukey multiple comparisons of means
 95% family-wise confidence level

Fit: aov(formula = FluorescenceValue ~ strain, data = F10M)

$strain
          diff          lwr          upr          p adj
ABC.37-ABC.30  52.33333 -866.5533  971.219966 0.9999538
YZ.30-ABC.30 3453.66667 2534.7800 4372.553299 0.0000003
YZ.37-ABC.30 1345.00000  426.1134 2263.886632 0.0037028
Yze.30-ABC.30 2070.66667 1151.7800 2989.553299 0.0000753
Yze.37-ABC.30 1150.33333  231.4467 2069.219966 0.0120079
YZ.30-ABC.37 3401.33333 2482.4467 4320.219966 0.0000004
YZ.37-ABC.37 1292.66667  373.7800 2211.553299 0.0050591
Yze.30-ABC.37 2018.33333 1099.4467 2937.219966 0.0000970
Yze.37-ABC.37 1098.00000  179.1134 2016.886632 0.0165696
YZ.37-YZ.30  -2108.66667 -3027.5533 -1189.780034 0.0000628
Yze.30-YZ.30 -1383.00000 -2301.8866  -464.113368 0.0029587
Yze.37-YZ.30 -2303.33333 -3222.2200 -1384.446701 0.0000257
Yze.30-YZ.37   725.66667  -193.2200 1644.553299 0.1573709
Yze.37-YZ.37  -194.66667 -1113.5533  724.219966 0.9768131
Yze.37-Yze.30 -920.33333 -1839.2200  -1.446701 0.0495591

>
> tukey.cld <- multcompLetters4(aov.out, tukey)
> print(tukey.cld)
$strain
YZ.30 Yze.30 YZ.37 Yze.37 ABC.37 ABC.30
  "a"  "b"  "bc"  "c"  "d"  "d"

```

Figura C.12: Expresión de SmeABC y SmeYZ en un medio de cultivo a pH alcalino a las 48h.