



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización del sistema de dos componentes 4886/4885 en *Pseudomonas aeruginosa* y determinación de su regulón.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
MIRANDA MADRID ALESI

TUTOR PRINCIPAL:
DR. DIMITRIS GEORGELLIS
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DR. JOSE LUIS PUENTE GARCÍA
[Instituto de Biotecnología, Cuernavaca](#)
DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ
[Instituto de Biotecnología, Cuernavaca](#)

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. mayo, 2024



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.



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Graduación con trabajo escrito)**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

“Caracterización del sistema de dos componentes 4886/4885 en *Pseudomonas aeruginosa* y determinación de su regulón.” que presenté para obtener el grado de Maestría es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Alesi Miranda Madrid

312009311

Agradecimientos

En primera instancia agradezco infinitamente a mis padres por su amor incondicional, es principalmente gracias a su apoyo que me es posible mantener un balance en cuanto a mi vida social, salud mental, física y emocional, lo cual me ha permitido comenzar a construir una carrera en este ámbito académico que considero mi pasión.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular en el laboratorio 226 norte bajo la tutoría del Dr. Dimitris Georgellis, a quien agradezco por todo su conocimiento, apoyo, amabilidad y paciencia. Su confianza y dirección me han impulsado a dar lo mejor de mí como estudiante y ha sido un honor aprender de él constantemente.

Agradezco al Dr. Adrián F. Álvarez. por su asesoría, a la M en C. Claudia Rodríguez Rangel por su apoyo técnico y a la M en C. Fernanda Contreras por todo su apoyo y orientación en el desarrollo de este proyecto. Su ayuda incondicional fue imprescindible para obtener los resultados importantes descritos en esta tesis, es un placer y un gran logro académico formar parte de este grupo de investigación y haber participado en este proyecto que me encanta y me ha permitido aprender muchísimo.

Agradezco el apoyo económico brindado a los proyectos:

- “Control de la expresión génica microbiana por estímulos extracelulares” de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN209924.
- “Estudio de microdominios membranales similares a balsas lipídicas en *Pseudomonas aeruginosa*” de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), # IN213724.
- “Control del Sistema de Dos Componentes BarA/UvrY” del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), CF 19-514856.

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de Beca de (Maestría) (#1176111).

Agradezco al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” (PAEP) por el apoyo proporcionado.

Contenido

Introducción	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Sistemas regulatorios bacterianos.....	7
Sistemas de dos componentes.....	7
Descripción general de la transducción de señales de dos componentes.....	8
Fosforilación y desfosforilación	8
Los TCS como blanco terapéutico.....	9
TCS en <i>P. aeruginosa</i>	10
Objetivo general.....	10
Objetivos particulares	11
Hipótesis.....	11
Metodología.....	11
Protocolo de clonación.....	11
Conjugación.....	13
Infección de <i>Galleria mellonella</i> con <i>P. aeruginosa</i>	14
Ensayo de piocianina.....	14
Ensayo de elastasa	14
Ensayo de hemolisina.....	15
Ensayo de biopelícula.....	16
Ensayo de pioverdina	16
Resultados.....	17
1. Construcción de mutantes <i>rstA</i> (RR), <i>rstB</i> (HK), 4885 (RR) 4886 (HK) <i>purH</i> en <i>P. aeruginosa</i> PA14.....	17
Construcción de plásmidos suicida.....	17
Transformación y Conjugación.	17

2. Determinación del efecto de la delección y sobreexpresión de estos genes sobre el fenotipo de <i>P. aeruginosa</i> PA14 asociado a factores de virulencia.....	18
Efecto en la producción de piocianina.....	18
Efecto en la producción de elastasa	19
Efecto en la producción de hemolisina.....	20
Efecto en la producción de biopelícula.....	21
Efecto en la producción de pioverdina.	22
3. Determinar el efecto de la delección y sobreexpresión de los genes RstA, RstB, 4885 y 4886 sobre la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PA14 en <i>Galleria mellonella</i>	23
Discusión	24
Conclusión.....	31
Perspectivas	31
Referencias	31

Introducción

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es un patógeno oportunista muy versátil con gran importancia clínica y epidemiológica, que es capaz de causar infecciones tanto agudas como crónicas. Su perfil patogénico se deriva del amplio y variable arsenal de factores de virulencia y determinantes de resistencia a los antibióticos alojados en su genoma que le confieren una notable flexibilidad metabólica y la capacidad de adaptarse a múltiples condiciones, incluida la respuesta inmunitaria del huésped [1], [2].

Este patógeno oportunista está vinculado con mayor frecuencia a infecciones en pacientes cuyo sistema inmunitario se vuelve menos eficaz debido a; enfermedades subyacentes como el cáncer, la leucemia o la fibrosis quística (FQ); a lesiones corporales masivas que incluyen lesiones graves, quemaduras o heridas; o por intervenciones terapéuticas importantes como la radioterapia [3].

P. aeruginosa es una causa importante de infecciones hospitalarias, siendo particularmente problemática en las unidades de cuidados intensivos. Sus infecciones están asociadas con una alta morbilidad y mortalidad en muchos grupos, incluidas las personas con neumonía asociada a la atención médica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o FQ [2]. El principal problema clínico para los pacientes con FQ es una pérdida progresiva de la función pulmonar causada por una infección crónica con *P. aeruginosa*, que provoca la muerte prematura de más del 80% de los pacientes [4].

P. aeruginosa se encuentra en la categoría "crítica" de la lista prioritaria de patógenos bacterianos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicada en 2017, para los cuales se necesita con urgencia la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos.¡<

La infección por *P. aeruginosa* involucra una serie de etapas que comienzan con la adherencia bacteriana y continúan con la colonización, invasión, diseminación y finalmente puede llegar a provocar enfermedades sistémicas severas. Su patogénesis está determinada por múltiples factores de virulencia, incluidos los productos secretados (toxinas, exopolisacáridos y enzimas), los componentes de la superficie celular (cápsulas, lipopolisacáridos, glicoproteínas y lipoproteínas) así como los sideróforos (pioquelina y la pioverdina). Todos estos factores tienen un papel importante en el metabolismo y el crecimiento bacteriano, además de estar implicados en fenotipos de virulencia complejos, como la adherencia a las células y tejidos del huésped, la formación de biopelículas, el

twitching, el *swimming* y el *swarming*. Asimismo, permiten que las bacterias escapen de las defensas del huésped y desencadenen una variedad de enfermedades, como infecciones respiratorias, cutáneas, sanguíneas y del tracto urinario [5].

Comprender la expresión de estos genes es un área de gran importancia en la investigación de infecciones por *P. aeruginosa*. Existen dos tipos de sistemas de regulación para estos factores, uno es el quorum sensing y el otro consiste en los sistemas de dos componentes (TCS) [6].

Sistemas regulatorios bacterianos

Existen cambios constantes en el ambiente de los microorganismos debido a variaciones en los parámetros fisicoquímicos como la temperatura, la luz y la presión parcial de oxígeno. Por lo que la capacidad de los organismos para adaptarse a hábitats en constante cambio es de gran importancia para sobrevivir en ellos, y requiere la coordinación de múltiples respuestas celulares [7], [8].

Los sistemas de detección de las bacterias pueden ser activados por estímulos tanto mecánicos como químicos, y posteriormente los procesan para generar una respuesta eficiente. La adquisición de nutrientes, la desintoxicación de la célula, la detección de la presencia de bacterias vecinas, la regulación de la expresión de factores de virulencia y la integración de nuevo material de ADN en la célula, son algunos de los procesos más comunes en los que las bacterias interactúan con su entorno. Existe una amplia gama de procesos de adaptación molecular que procesan estas señales y modulan los procesos celulares a niveles transcripcional, traduccional y postraduccional. Un elemento central de estas respuestas es la modulación de la transcripción del ADN, esta comúnmente se lleva a cabo por un grupo de proteínas de transducción de señales que constituyen la gran familia de TCS [8], [9].

Sistemas de dos componentes

Los TCS son circuitos reguladores de la transducción de señales basados típicamente en una histidina quinasa (HK) unida a la membrana y un regulador de respuesta (RR) citoplásmico que actúa normalmente como un factor de transcripción. Los circuitos reguladores acoplados a TCS muestran respuestas a estímulos ambientales que activan una HK responsable de expresar ciertos genes a través del RR [10].

Los TCS son los sistemas reguladores más comunes en las bacterias [11], son increíblemente versátiles y brindan una herramienta indispensable para sensor y reaccionar a su entorno. Asimismo, estos sistemas son esenciales para la expresión coordinada de factores de virulencia y, en algunos casos, para la viabilidad y el crecimiento bacteriano [12].

Las condiciones ambientales que activan los TCS incluyen la exposición a antibióticos, lo cual resulta en la activación de defensas contra los antibióticos y cambios en la fisiología celular que aumentan la resistencia ellos. Los mecanismos de resistencia activados por los TCS abarcan los que se encuentran tanto en especies Gram negativas como Gram positivas e incluyen modificaciones de la superficie celular, cambios en la permeabilidad, aumento de la formación de biopelículas y regulación positiva de las enzimas que degradan los antibióticos [13].

Descripción general de la transducción de señales de dos componentes.

Los TCS suelen estar compuestos por una HK que recibe los estímulos de entrada y se autofosforila en un residuo de His, creando un grupo fosforilo de alta energía, que a su vez, transfiere a un RR que efectúa un cambio apropiado en la fisiología celular. La función de los TCS se basa en el hecho de que las actividades de los RR fosforilados y no fosforilados difieren. El estado de fosforilación de la HK es el parámetro crítico que determina la transfosforilación hacia su RR afín y, por lo tanto, los cambios en la expresión génica [14].

Muchas HK están codificadas en el mismo operón que sus reguladores afines, lo que permite identificar los pares afines mediante análisis de secuencia [7].

Fosforilación y desfosforilación

Las vías de fosforilación y desfosforilación son la base de la señalización de dos componentes. En algunos circuitos, la HK juega un papel solo en la fosforilación del RR. Sin embargo, en muchos TCS, la HK participa en la fosforilación y desfosforilación de su RR asociado. Para estas HK bifuncionales, el estímulo de entrada controla la relación entre la actividad quinasa y fosfatasa de la proteína, modulando una o ambas de estas reacciones y, por lo tanto, estableciendo el nivel de fosforilación del regulador de respuesta. El nivel de regulador de respuesta fosforilado (RR-P) es robusto o insensible a las fluctuaciones de las concentraciones de proteínas HK y RR [15].

Los TCS como blanco terapéutico

Dado el papel esencial de los TCS en la homeostasis bacteriana, así como los diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos que se pueden activar a través de ellos, los TCS son un objetivo interesante para el desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas [16]. Los inhibidores selectivos de TCS tienen una toxicidad mínima para las células de mamíferos, ya que los sistemas de transducción de señales bacterianas basados en la fosforilación de histidina son distintos a los sistemas de señalización de fosforilación de serina/treonina y tirosina que normalmente se encuentran en eucariontes superiores [12].

Comúnmente, los antibióticos convencionales se dirigen a proteínas bacterianas específicas que realizan funciones esenciales en el patógeno; sin embargo, un fármaco que se dirige a los TCS podría ser muy eficaz porque perjudica las funciones reguladoras relacionadas con la fisiología del patógeno en lugar de afectar solo funciones específicas. Por lo tanto, el uso de TCS para el desarrollo de fármacos proporciona una estrategia alternativa para combatir las infecciones microbianas, incluidas las causadas por patógenos resistentes a los antibióticos actualmente disponibles como *P.aeruginosa* [17]. Hay gran cantidad de microorganismos como este, cuyas enfermedades tienen alta mortalidad o dificultad de tratamiento por el problema creciente de resistencia a antibióticos y representan un grave inconveniente para el sector salud.

Es evidente el éxito de la señalización de los TCS como estrategia para acoplar cambios en el medio ambiente a cambios en la fisiología celular por su prevalencia en todo el reino bacteriano. Estas proteínas de señalización se han encontrado en los genomas de casi todas las bacterias secuenciadas, y la mayoría de las especies codifican docenas, y a veces cientos, de proteínas de dos componentes [7].

Desde la viabilidad, factores de virulencia, respuestas al estrés hasta la resistencia a antibióticos, los TCS son una red especializada para asegurar una supervivencia óptima de los microorganismos. Por lo tanto, los TCS como dianas farmacológicas son una alternativa interesante, ya que estos sistemas podrían ser inactivados como una vía regulatoria completa en lugar de generar tratamientos para cada sensora quinasa o regulador de respuesta independiente y de esta manera atacar múltiples aspectos fisiológicos y de patogenicidad de bacterias sin afectar al organismo huésped.

TCS en *P. aeruginosa*

En el ambiente clínico, las biopelículas bacterianas son reconocidas como un factor determinante de la enfermedad y son extremadamente difíciles de erradicar por el alto nivel de resistencia a los antimicrobianos. *P. aeruginosa* es un organismo modelo para la formación de biopelículas, que *in vitro* es un proceso altamente regulado que pasa por una serie de etapas distintas; la adhesión inicial, la formación de microcolonias, la maduración y la dispersión.

A partir de estímulos del ambiente, los TCS son el mecanismo que regula el cambio de un estilo de vida bacteriano móvil a uno sésil mediante la producción de factores que contribuyen a la formación de biopelícula como los apéndices extracelulares (por ejemplo, los flagelos y los pili), que suelen estar asociados a la adhesión inicial a una superficie, y los polisacáridos, como el Pel y el Psl, que desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la comunidad [18]

La importancia del cambio en el estilo de vida de la bacteria, que va a conducir a la formación de biopelícula y desencadenar en una enfermedad difícil de erradicar, recae en los TCS que regulan la producción de factores que llevan a la formación de biopelícula.

Por ejemplo, la red GacS desempeña un papel de liderazgo en el control de la transición entre los modos de infección aguda y crónica. En este sistema, múltiples HKs trabajan juntas para detectar e integrar varias señales diferentes para llegar a una decisión equilibrada. Cuando la señalización de GacS está activa, el RR GacA será fosforilado y esto favorecerá el modo crónico de infección [19].

El sistema de dos componentes RstA/B está relacionado con la regulación de virulencia bacteriana, producción de biopelícula y movilidad en otros microorganismos [20], [21]. En este proyecto se pretende determinar el efecto de la en la virulencia de *P. aeruginosa* y el regulón de este TCS así como el del TCS 4886/4885, que ha sido reportado como esencial para la virulencia en *P. aeruginosa*[19].

Objetivo general

Caracterizar los sistemas de dos componentes rstB/rstA y 4886/4885. Identificar su papel en la virulencia de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14.

Objetivos particulares

1. Construir mutantes de los genes *4886* (HK), *4885* (RR), *rstA* (RR), *rstB* (HK), *purH* en *P. aeruginosa* PA14.
2. Determinar el efecto de las mutantes de estos genes sobre el fenotipo de *P. aeruginosa* PA14 asociado a factores de virulencia.
3. Determinar el efecto de las mutantes de estos genes sobre el fenotipo de *P. aeruginosa* PA14 asociado a la capacidad de causar mortalidad en larvas de la polilla de la cera, *G. mellonella*.

Hipótesis

El sistema de dos componentes 4886/4885 regula genes relacionados a la virulencia de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14.

Metodología

Protocolo de clonación.

En la clonación por digestión con enzimas de restricción, los fragmentos del vector y el inserto se digieren dos veces con dos enzimas de restricción que generan extremos pegajosos o cohesivos, y posteriormente se lleva a cabo una reacción de ligación direccional (con orientación) del inserto y el plásmido gracias a la hibridación de estos extremos complementarios [22].

Se crearon plásmidos capaces de provocar el remplazo de los genes de interés por una mutación en el cromosoma de *P. aeruginosa* mediante el intercambio alélico por recombinación homóloga. El plásmido pEX18Ap-AprA (pExIJA) fue generado a partir del plásmido suicida en *P. aeruginosa* pEx18Ap, en el cual se clonó entre los sitios de restricción SmaI-BamHI el gen de resistencia a apramicina/gentamicina, proveniente del plásmido pIJ773. Este plásmido proporciona resistencia a ampicilina en *E. coli*, lo cual permitió seleccionar a las colonias que habían sido transformadas exitosamente y el gen de resistencia a gentamicina permitió la selección de las colonias de *P. aeruginosa* merodiploides. El plásmido a su vez contiene el gen *sacB* de *Bacillus subtilis* que codifica la levansacarasa, enzima que cataliza la hidrólisis de la sacarosa y la síntesis de polisacáridos de leván, que son polímeros de fructosa de alto peso molecular. La actividad

de esta enzima en el periplasma de bacterias confiere una sensibilidad aguda a la sacarosa y permite la selección de las mutantes en medio con sacarosa, ya que solo las bacterias que han perdido la expresión del gen *sacB* pueden crecer en esta condición, las colonias presentes en este medio han realizado una segunda recombinación homóloga que tiene como consecuencia la restauración del gen silvestre o la inserción del alelo mutante [23].

Ejecutar PCR para amplificar el inserto de ADN. Es importante utilizar una polimerasa taq de alta fidelidad para minimizar las mutaciones. La fidelidad de la polimerasa se vuelve más importante cuanto más largo es el producto de PCR esperado. Seleccionar una temperatura de hibridación basada en la temperatura de fusión (T_m) de la porción del cebador que se hibrida con la secuencia que se va a amplificar (el ORF en este caso), no en la T_m de todo el cebador.

Purificar producto de PCR del resto de la reacción con QIA Quick Gel Extraction Kit. Extraer plásmido pEXIJA de cepa que lo contiene guardada en -80°C .

Realizar reacción de digestión enzimática de 50 μl con 5 μl de ADN (plasmídico e inserto). Es fundamental verificar que el plásmido fue linearizado, por lo tanto, es importante que la digestión dure al menos 4 horas y/o durante toda la noche. Utilizar la SAP (fosfatasa alcalina de camarón) para evitar la recirculación del vector. Aislar inserto y vector mediante purificación en gel. Determinar la concentración de ADN recuperado.

Ligar el inserto con el vector: adicionar a una reacción de ligación de 20 μl una proporción de aproximadamente 3:1 de inserto:plásmido. También es importante establecer controles negativos en paralelo. Por ejemplo, una ligadura del ADN del plásmido receptor sin ningún inserto indicará plásmido receptor sin cortar o religación. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.

Descongelar, en hielo, un tubo Eppendorf de 100 μl de células TOP10 para cada reacción de ligación y su respectivo control. Pipetear de 5 μl de cada reacción a 50 μl directamente en el cultivo de células competentes y mezclar golpeando suavemente. No mezclar pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Las mezclas de ligadura restantes se pueden almacenar a -20°C . Incubar los viales en hielo durante 30 minutos. Incubar durante exactamente 1.5 min a 42°C . Agregar 750 μl de medio LB a cada vial. Agitar los viales a 37°C durante exactamente 1 hora a 225 rpm en una incubadora con agitación a 250 rpm. Centrifugar a 6000 rpm por 4 min, decantar y plaquear en cajas de LB con el antibiótico de selección.

Incubar a 37°C durante la noche. Seleccionar colonias y confirmar mediante PCR.

Conjugación

Los plásmidos de intercambio alélico usados como base de las construcciones contienen el origen de transferencia (*oriT*) del plásmido RP4, esta secuencia es reconocida por una endonucleasa que corta el ADN del plásmido, asimismo, la transferencia de plásmido y la síntesis de ADN conjugativo unidireccional de una sola hebra de ADN de la célula donadora a la receptora deben iniciarse a partir de *oriT* [24]. Debido a lo anterior, con mayor frecuencia estos vectores son transferidos por conjugación de *E. coli* a *P. aeruginosa*, y es reportado que el proceso es más eficaz que la electroporación [23].

Extraer plásmido de cepas TOP 10 confirmadas por PCR.

Centrifugar 1 ml de cultivo *E.coli* S-17. Resuspender en 1 ml de glicerol al 10%. Mezclar con vortex y posteriormente centrifugar a 8000 rpm por 2 min. Decantar y repetir dos veces, resuspender con 100 µl de glicerol al 10% y 1 µl de ADN. Electroporar con 1.8 kV. Adicionar 700 µl de LB e incubar con agitación a 250 rpm y a una temperatura de a 37°C durante 1 hora. Plaquear en LB con antibiótico de selección.

Incubar por la noche a 37°C en 5 ml de caldo LB la cepa donadora *E.coli* S-17 con el plásmido a transferir y la cepa receptora *P. aeruinos*a UCBPP-PA14.

Para las cepas receptoras de *P. aeruinos*a, diluir el cultivo saturado 1:1 en LB líquido e incubar a 42°C durante 3 horas.

Para las cepas donadoras *E.coli* S-17, preparar un cultivo de OD₆₀₀ inicial de 0.05 en un matraz con 10 ml de LB, incubar a 37° con agitación a 250 rpm y cuando tengan OD₆₀₀ de 0.5, centrifugar 3 ml del cultivo de la cepa donadora, quitar sobrenadante y lavar 1 vez con LB, agregar 600 µl del cultivo de la cepa receptora de *P. aeruinos*a, centrifugar juntas, tirar sobrenadante y pipetear 100 µl en una placa de LB, incubar a 30°C por la noche.

Al día siguiente recuperar conjugación en 1 ml de PBS y plaquear en VBMM con gentamicina 100 µg/ml. Incubar por la noche a 37°C. Seleccionar colonias y hacer parches en PIA (medio de aislamiento de *Pseudomonas*) con gentamicina 100 µg/ml e incubar a 37°C por la noche. Comprobar por PCR.

Seleccionar parches de cepas merodiploides confirmadas y estriar en medio TYS10 (medio con triptona y extracto de levadura) con sacarosa e incubar a temperatura ambiente por 48 horas.

Hacer parches en placas de algunas colonias e incubar a 37°C por la noche.

Probar por PCR los parches y hacer cultivo de cepas mutantes de 5 ml en medio LB líquido por la noche, para el día siguiente guardar la cepa en glicerol a -80°C.

Infeción de *Galleria mellonella* con *P. aeruginosa*

Realizar un cultivo de 24 horas de la cepa requerida en LB a 37° y en agitación a 250 rpm, diluir con este mismo medio de cultivo para llegar a una OD₆₀₀ de 1 en 1 ml de LB, centrifugar a 7000 rpm 5 min, descartar sobrenadante y resuspender células con cuidado en 1 ml de solución salina estéril a 0.9%. Medir de nuevo la OD₆₀₀ de la solución y realizar una serie de diluciones 1:10 en solución salina al 0.9% estéril hasta la séptima dilución.

Posteriormente, inyectar con jeringas de insulina de 0.3 ml a 10 larvas de *G. mellonella* con 20 µl de la dilución seleccionada (10⁻⁶ o 10⁻⁷). Realizar la inyección en el centro de la larva entre las últimas y las penúltimas pseudopatas, con una inclinación de 45 grados, de forma que la aguja llegara al centro de la larva. Tras inyectar, plaquear por duplicado 100 µL de las diluciones 10⁻⁶ y 10⁻⁷ en placas con LB agar al 1.5% para contar unidades formadoras de colonias (UFC). Finalmente, incubar las larvas inyectadas a 37°C en cajas Petri y dar seguimiento registrando su curva de supervivencia. Como control, en cada experimento se inyectaron 5 larvas con solución salina siguiendo el mismo procedimiento.

Ensayo de piocianina

Realizar cultivos de las cepas a evaluar en medio líquido PB de OD₆₀₀ inicial de 0.05 e incubar a 37°C con agitación a 250 rpm por 24 horas.

Determinar y registrar OD₆₀₀ a las 24 horas. Tomar 1.5 ml del cultivo y centrifugar a 13000 rpm por 3 min. Transferir 1 ml del sobrenadante a un tubo Eppendorf de 2 ml y añadir 600 µl de cloroformo. Mezclar con vortex durante 1 min y posteriormente centrifugar 13000 rpm por 1 min.

Tomar 500 µl de la fase de cloroformo y transferir a otro tubo eppendorf, adicionar 800 µl de HCL 0.2 N. Mezclar con vortex durante 1 min y posteriormente centrifugar 13000 rpm por 1 min. Tomar 650 µl de la fase acuosa (superior) y medir directamente a 520 nm.

Ensayo de elastasa

Realizar cultivos de las cepas a evaluar en medio líquido LB e incubar a 37°C con agitación a 250 rpm O/N.

Tomar 2 ml del cultivo y pasarlo a tubo Eppendorf. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min. Obtener el sobrenadante decantándolo.

Hacer una dilución con 100µl de sobrenadante y 900 µl de Buffer de elastasa (Tris-HCl 100mM, CaCl₂ 1mM, pH 7.5) por duplicado. Para el control diluir 100 µl de LB con 900 µl de Buffer.

En un tubo Eppendorf vacío, pesar 0.006 g de elastina-rojo Congo. Hacer un tubo por cada muestra. La elastina es un sustrato de la elastasa LasB. La elastina-rojo Congo es cortada por LasB, resultando en elastina y rojo Congo por separado. Así, el rojo Congo puede ser determinado por espectrofotometría. A ese tubo agregar 50 µl de la dilución y 950 µl del Buffer de elastasa. Dejar en agitación por 2 horas, asegurándose cada 30 min que se esté mezclando bien. Parar reacción adicionando 700 µl de Buffer de terminación de elastasa (Tris 20 mM, CaCl₂ 2mM, NaH₂PO₄ 0.7 M.

Centrifugar por 3 min a 13,000 rpm Si la muestra tiene mucho color, hacer una dilución con 900 µl de muestra y 100 µl de agua. Si no, hacer dilución con 500 µl de muestra y 500 µl de agua.

Medir en el espectrofotómetro a 495 nm, usando agua como blanco. Multiplicar el resultado por 2 o por 10, dependiendo de la dilución.

Ensayo de hemolisina

Realizar cultivos de las cepas a evaluar en medio líquido LB e incubar a 37°C con agitación a 250 rpm O/N.

A partir de los cultivos O/N preparar un cultivo de OD₆₀₀ inicial de 0.05 en un matraz con 10 ml de LB, incubar a 37° con agitación y cuando tengan OD₆₀₀ de 2 (fase estacionaria temprana).

Extraer sangre total heparinizada, tomar 2 ml en 1 eppendorfs de 1.5 ml, centrifugar a 3000 rpm por 10 min. Realizar 3 lavados con PBS pH 7.4.

Preparar tubos Eppendorf control con 100 µL:

1. Control negativo: PBS:etanol 9:1
2. Control positivo: tritón 1%
3. Control positivo: SDS 1%

Etiquetar tubos Eppendorf vacíos para cada cepa a evaluar. Adicionar 100 μ L de cultivo en cuanto llegue a una OD₆₀₀ de 2.

Adicionar a todos los tubos al mismo tiempo 1 ml de sangre al 2% con PBS. Homogeneizar e incubar por 1 hora a 37°C sin agitación.

Centrifugar a 3000 rpm por 10 min. Medir sobrenadante a 545 nm.

Ensayo de biopelícula

Realizar cultivos de las cepas a evaluar en medio líquido LB e incubar a 37°C con agitación a 250 rpm O/N. A partir de los cultivos O/N preparar cultivos (200 μ L) de OD₆₀₀ inicial de 0.05 en una placa de 96 pozos con medio M63. Incubar a 30°C 24 horas.

Vaciar cultivo de la placa y realizar 2 lavados con PBS.

Adicionar 220 μ L fijador glutaraldehído al 1.1% Incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Vaciar fijador y secar placa.

Adicionar 220 μ L de cristal violeta 0.1%. Incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Vaciar cristal violeta, realizar 2 lavados y secar placa.

Adicionar 220 μ L de ácido acético 30%. Incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Resuspender y leer a 570 nm.

Ensayo de pioverdina

Realizar cultivos de las cepas a evaluar en medio líquido LB e incubar a 37°C con agitación a 250 rpm O/N. Al día siguiente diluir 1:10 en medio succinato de restricción de hierro, e incubar a 30°C con agitación 220 rpm durante 24 horas. Al día siguiente, diluir nuevamente en medio succinato 1:10 e incubar a 30°C con agitación 220 rpm durante 24 horas.

Configurar espectrofluorímetro a una longitud de onda de excitación de 400 nm y un rango de longitud de onda de 410 a 600 nm. La lámpara debe tener una intensidad de 60 W y el fotomultiplicador un voltaje de 900 V.

Tomar 100 μ L del cultivo y transferir a una celda de cuarzo, completar a 1 ml con buffer Tris-HCl pH 8.0, mezclar y medir. La pioverdina tiene una absorbancia a 380 nm o 400 nm dependiendo del pH, es fluorescente a 447 nm. La forma férrica de la pioverdina no es fluorescente.

Resultados

1. Construcción de mutantes *rstA* (RR), *rstB* (HK), 4885 (RR) 4886 (HK) *purH* en *P. aeruginosa* PA14.

Construcción de plásmidos suicida

Para las mutantes de *rstA*, *rstB*, 4885 y 4886 se usó el protocolo de clonación tradicional.

Se insertaron al plásmido pEXIJA regiones flanqueantes río arriba (UP) y río abajo (DOWN) de los genes de interés y con secuencias de ADN homólogas al cromosoma receptor.

Las regiones río arriba de *rstA*, *rstB*, 4885 y 4886 se clonaron con HindIII-SbfI, y las regiones río abajo se clonaron con SbfI-BamHI. Para el gen de la HK RstB, con nombre en la cepa *P. aeruginosa* UCBPP-PA14 de PA14_RS20080 y de un tamaño de 1359 pares de bases (pb) se clonó primero el fragmento río abajo RstBDOWN de 860 pb, con las enzimas SbfI y BamHI en el plásmido pEXIJA. Ya que, al analizar la secuencia de los fragmentos, se determinó que hay un sitio de escisión de la enzima BamHI en medio del fragmento RstBUP. Esta enzima se utiliza para la clonación de RstBDOWN en pEXIJA, la presencia del fragmento RstBUP con su sitio de escisión en pEXIJA propiciaría a un ensamblaje incorrecto con el fragmento RstBDOWN. Esto puede evitarse con la inserción del fragmento RstbDOWN a pEXIJA, con las enzimas SbfI y BamHI, antes de su clonación con RstBUP.

Los insertos de las regiones flanqueantes que fueron insertados primero, fueron productos de PCR purificados en gel, y los insertos clonados después fueron productos de PCR insertados a pGEM.

Transformación y Conjugación.

Se llevó a cabo la transformación de células quimiocompetentes *E.coli* TOP10 con los plásmidos suicidas construidos. Se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina en el caso de la captación del plásmido pEXIJA *rstA*, pEXIJA *rstB*, pEXIJA 4885 y pEXIJA 4886 y las colonias resistentes a gentamicina para el plásmido pEX18Gm *purH*.

Se llevó a cabo la extracción y transferencia de los plásmidos a *E.coli* S-17 por electroporación y posteriormente una segunda transferencia de este microorganismo a *P. aeruginosa* mediante conjugación. Se seleccionaron las colonias merodiploides en medio mínimo Vogel-Bonner (VBMM) con gentamicina, y posteriormente se estriaron en medio con sacarosa para propiciar la segunda recombinación homóloga y finalmente se comprobaron las mutantes por PCR.

2. Determinación del efecto de la delección y sobreexpresión de estos genes sobre el fenotipo de *P. aeruginosa* PA14 asociado a factores de virulencia.

Se generaron las mutantes de los sistemas de dos componentes a estudiar y se evaluaron las diferencias en estas cepas (*4886*⁻, *4885*⁻, *rstA*⁻, *rstB*⁻) y cepas con sobreexpresión del RR (*p4885*, *prstA*) con la cepa silvestre en cuanto a producción de factores de virulencia como pirocianina, pioverdina, elastasa y hemolisina. Asimismo, se evaluó la formación de biopelícula

Efecto en la producción de pirocianina

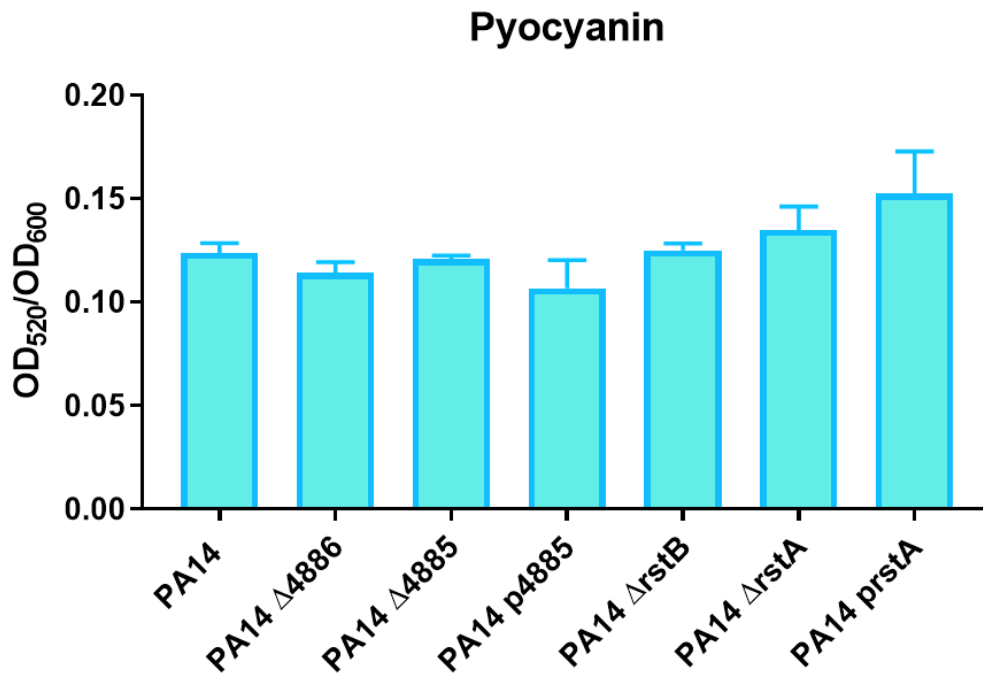


Figura 1. Medición de pirocianina en cepas de *P. aeruginosa* PA14 con mutaciones en HK, en RR o sobreexpresión de los RR de los TCS RstA/RstB y 4886/4885.

No se observa una diferencia significativa en la producción de este factor de virulencia en particular para las cepas evaluadas.

Efecto en la producción de elastasa

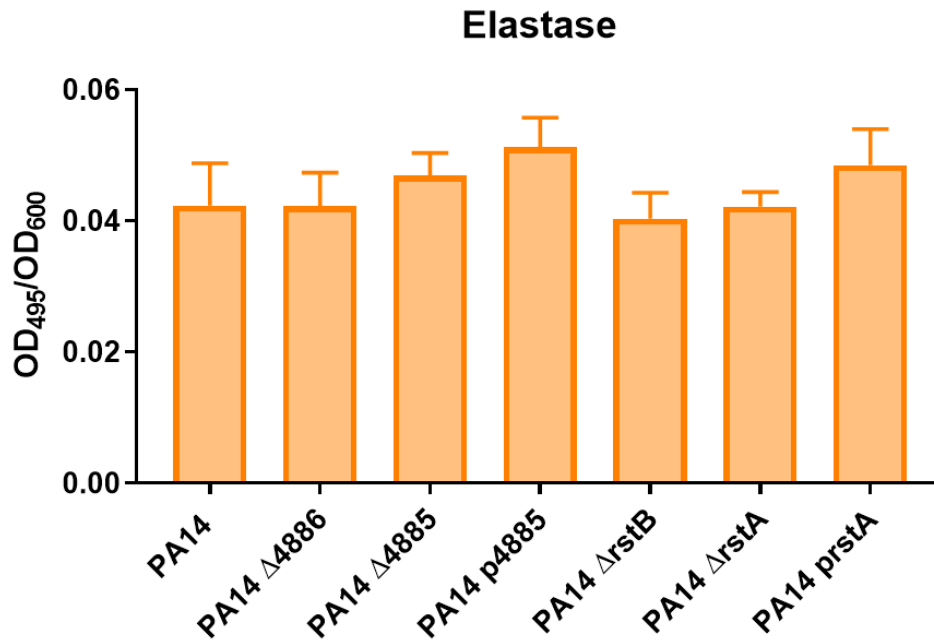


Figura 2. Medición de elastasa en cepas de *P. aeruginosa* PA14 con mutaciones en HK, en RR o sobreexpresión de los RR de los TCS RstA/RstB y 4886/4885. N=4

No se observa una diferencia significativa en la producción de este factor de virulencia en particular para las cepas evaluadas.

Efecto en la producción de hemolisina

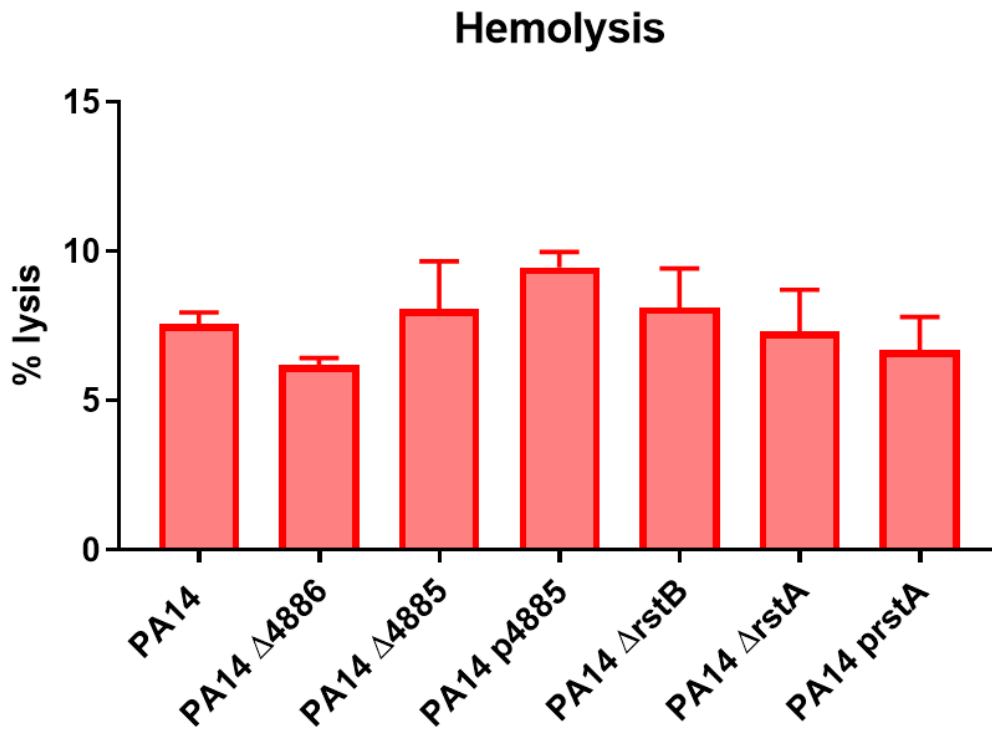


Figura 3. Medición de hemolisina en cepas de *P. aeruginosa* PA14 con mutaciones en HK, en RR o sobreexpresión de los RR de los TCS RstA/RstB y 4886/4885. N=3

No se observa una diferencia significativa en la producción de este factor de virulencia en particular para las cepas evaluadas.

Efecto en la producción de biopelícula

Se midió la formación de biopelícula para las cepas a evaluar.

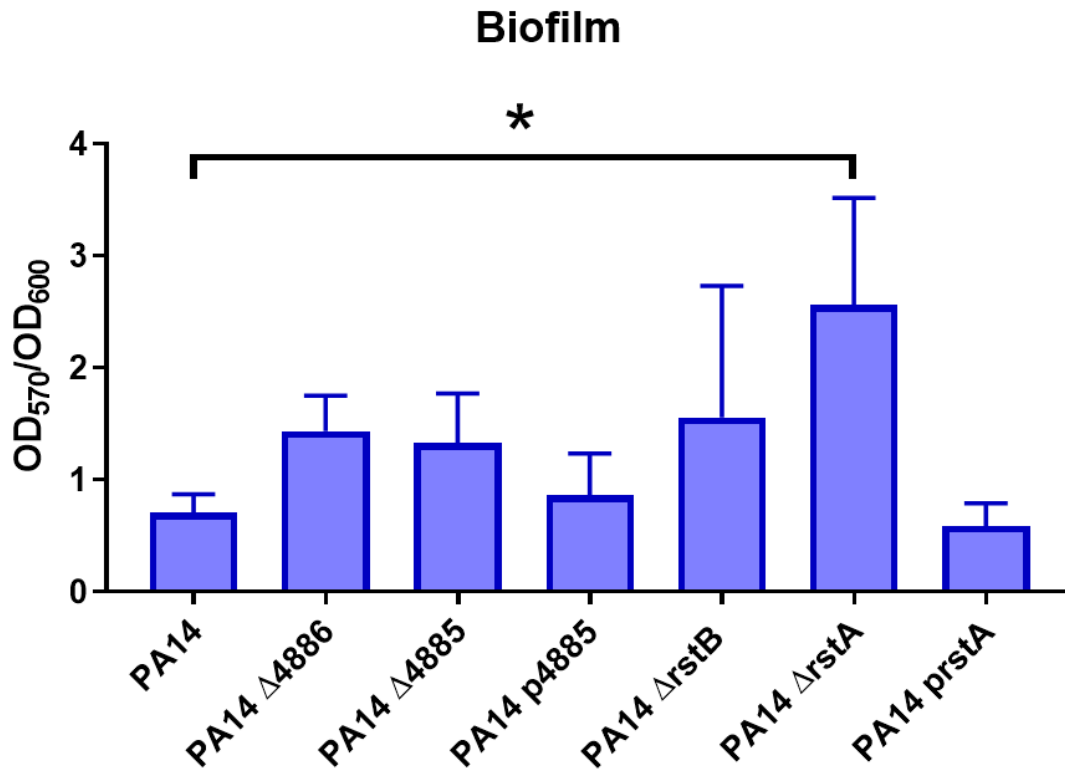


Figura 4. Medición de biopelícula en cepas de *P. aeruginosa* PA14 con mutaciones en HK, en RR o sobreexpresión de los RR de los TCS RstA/RstB y 4886/4885. N=4

En cuanto a este factor de virulencia, se observa por primera vez una tendencia al realizar los ensayos. La cepa *rstA*⁻ mostró una producción de biopelícula mucho mayor a la cepa silvestre de manera consistente. Existe una diferencia significativa, como se observa en la figura 3, al comparar los datos obtenidos de las cepas y asimismo al comparar la cepa *rstA*⁻ con las RstA pro y RstA ORF que contienen los plásmidos que sobre expresan el gen.

Efecto en la producción de pioverdina.

Se realizó la detección de pioverdina mediante espectrofluorimetría UV en Ex=370-410/Em=450-470. 900v para las cepas UCBPP-PA14 *rstB*, *rstA*, 4885 y 4886, adicionalmente se incluyó la cepa UCBPP-PA14 transformada con plásmidos pUCP24 que sobreexpresan los genes de los RR p4885 y *prstA*.

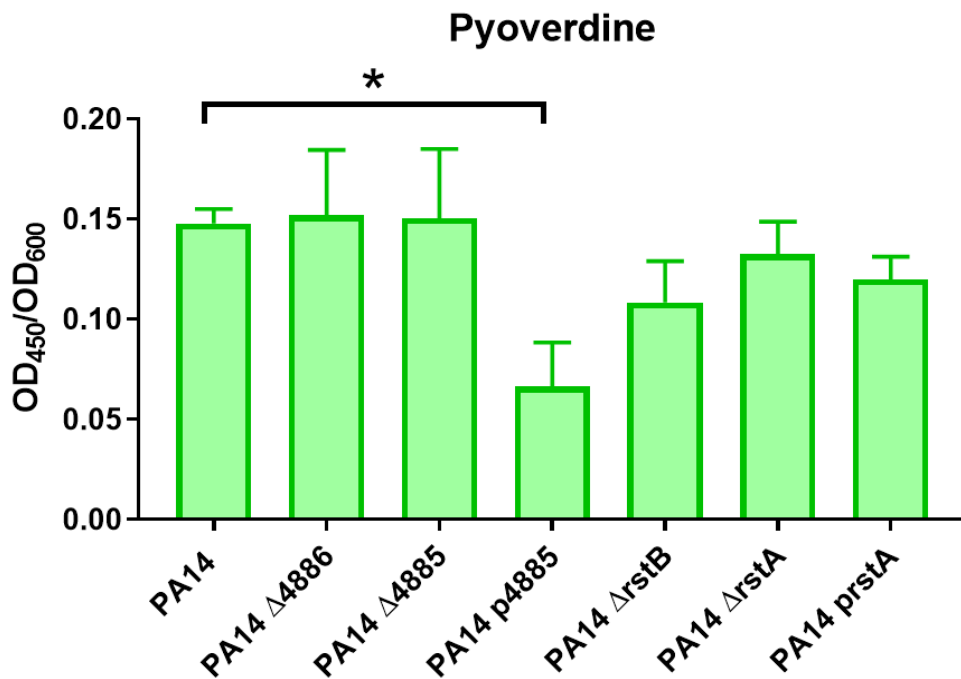


Figura 5. Medición de pioverdina en cepas de *P. aeruginosa* PA14 con mutaciones en HK, en RR o sobreexpresión de los RR de los TCS RstA/RstB y 4886/4885. N=4

No se observó una diferencia significativa al comparar las cepas mutantes con la silvestre. La sobreexpresión de 4885 RR condujo a una cantidad significativamente menor de pioverdina.

3. Determinar el efecto de la delección y sobreexpresión de los genes *RstA*, *RstB*, 4885 y 4886 sobre la virulencia de *P. aeruginosa* PA14 en *Galleria mellonella*.

Se administraron las diferentes cepas a las larvas de la polilla de la cera y se evaluaron las diferencias en las cepas mutantes de los TCS a evaluar (4886-, 4885-, *rstA*-, *rstB*-) y cepas con sobreexpresión del RR (p4885, *prstA*) con la cepa silvestre en cuanto a su capacidad para causar mortalidad.

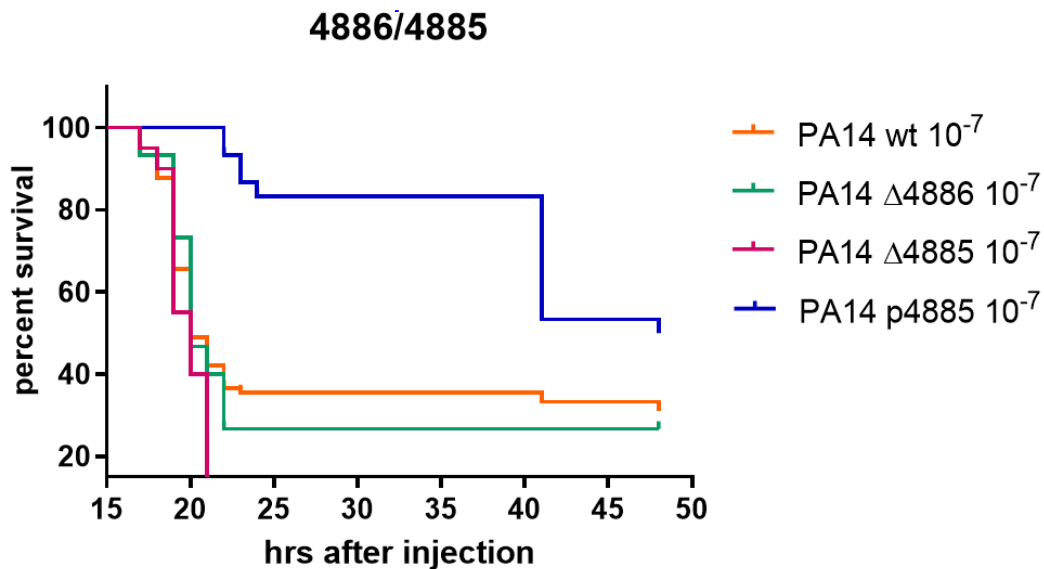


Figura 6. Supervivencia en *Galleria mellonella* posterior al tratamiento con cepas de *P. aeruginosa* con mutaciones en 4885, 4886 y sobreexpresión de 4885. Porcentaje de supervivencia en individuos inyectados con 20 μ l de una dilución 10^{-7} de una suspensión bacteriana de OD₆₀₀ de 1.

Se observa un mayor porcentaje de supervivencia en el grupo administrado con la cepa *P. aeruginosa* PA14 p4885, se encontró diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre mediante la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

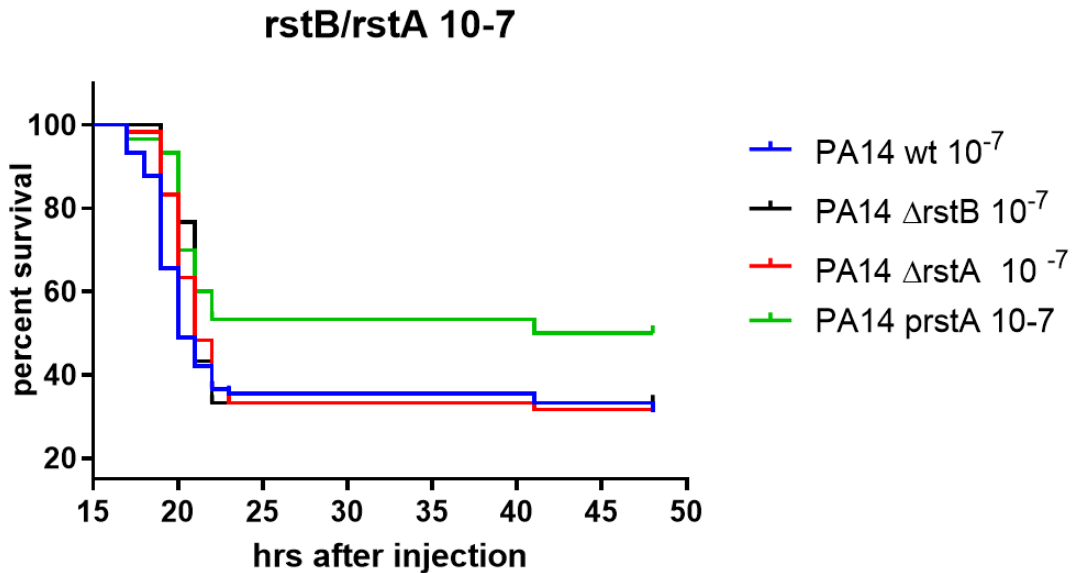


Figura 7. Supervivencia en *Galleria mellonella* posterior al tratamiento con cepas de *P. aeruginosa* con mutaciones en RstA, RstB y sobreexpresión de RstA. Porcentaje de supervivencia en individuos inyectados con 20 μ l de una dilución 10^{-7} de una suspensión bacteriana de OD₆₀₀ de 1.

No se observa una diferencia significativa de supervivencia entre las larvas tratadas con las distintas cepas.

Discusión

Las infecciones por *P. aeruginosa* se desarrollan en pacientes inmunocomprometidos y a menudo son nosocomiales, ya que las características del microorganismo le permiten adherirse y sobrevivir tanto en equipos médicos, como en otras superficies hospitalarias [2]. Estas infecciones demuestran una alta morbilidad y mortalidad ya que su erradicación se ha vuelto cada vez más difícil debido a los mecanismos de resistencia intrínsecos y adquiridos de este microorganismo a la mayoría de los antibióticos [1].

El tamaño genómico de *P. aeruginosa* es grande (6 millones de pares de bases) lo cual permite codificar muchas enzimas reguladoras para sobrevivir en condiciones adversas y tener gran versatilidad metabólica [25]. *P. aeruginosa* tiene una capacidad notable para prosperar en muchos entornos diferentes, tanto fuera como dentro de un huésped, y tiene la extraordinaria capacidad de colonizar casi todos los tipos de tejido humano [26].

Esto es debido a que es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno, puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C. Adicionalmente, *P. aeruginosa* cuenta con una gran cantidad de factores de virulencia que le permiten que evada el sistema inmunológico del huésped, y que favorecen la invasión mediante una adhesión efectiva, motilidad y la secreción de exotoxinas y proteasas [5]. Estos factores están siendo controlados por circuitos reguladores y sistemas de señalización interconectados increíblemente complejos, que le dan a este patógeno una gran plasticidad [2].

Los TCS constituyen un mecanismo importante mediante el cual *P. aeruginosa* detecta señales de su ambiente y modifica la expresión génica de múltiples mecanismos, incluyendo los factores de virulencia que le permiten generar infecciones. *P. aeruginosa* codifica un gran conjunto de más de 60 TCS que le permitan detectar y responder rápidamente a diversas señales externas [27]. Este es el número de TCS más alto identificado hasta ahora en bacterias y más del 50% de estos TCS se han relacionado con virulencia [19].

Los TCS 4886/4885 y RstB/RstA se han reportado como esenciales para la virulencia en *P. aeruginosa*, sin embargo, no se ha identificado la manera en la cual contribuyen [28]. Se generaron las mutantes de los TCS a estudiar y se evaluaron las diferencias en estas cepas (4886⁻, 4885⁻, rstA⁻, rstB⁻) y cepas con sobreexpresión del RR (p4885, prstA) con la cepa silvestre en cuanto a producción de factores de virulencia como piocianina, pioverdina, elastasa y hemolisina. Asimismo, se evaluó la formación de biopelícula y la capacidad de provocar muerte en larvas de *G. mellonella*.

Las cepas p4885 y prstA deberían presentar una sobreexpresión del RR y por lo tanto una mayor respuesta en cuando a la expresión de los genes que regula el TCS. Se insertó únicamente el gen en dirección con el promotor *lac* del plásmido pUCP24, este promotor es inducible en *E. coli* por lactosa pero en *P. aeruginosa* es constitutivo. La sobreexpresión en ambas cepas se da por la alta replicación del plásmido y esta gran cantidad de material genético disponible para su expresión.

Como se ha mencionado, se evaluó la producción de piocianina (PCN) en las cepas, ésta molécula constituye uno de los productos excretados durante la infección con *P. aeruginosa* [4]. La PCN es un compuesto aromático nitrogenado que cuenta con propiedades de bajo peso molecular y de zwitterion, ésta última le confiere un estado neutro a pH fisiológico y ambas características le permiten a la toxina permeabilizar membranas celulares. Esta

molécula azul-verde le da su color característico a *P. aeruginosa* y como toxina tiene un papel crucial en la infección por este microorganismo [29].

La exposición a PCN provoca la formación de especies reactivas de oxígeno que dañan componentes del ciclo celular y el ADN, además de provoca el agotamiento de NAD(P)H y la inhibición de enzimas [30]. Asimismo, se ha demostrado que PCN se intercala con ADN extracelular para promover interacciones de célula a célula entre las células de *P. aeruginosa* al influir en sus propiedades de superficie celular e interacciones fisicoquímicas. Por lo tanto, se ha sugerido que PCN también puede contribuir a la formación de biopelículas mediante la promoción de eDNA [31]. El estrés oxidativo inducido por PCN no solo provoca daño celular directo y muerte, sino también la persistencia de infecciones por lo que esta toxina es de gran importancia para la virulencia y patogenicidad de *P. aeruginosa*.

PCN también tiene efectos en la respuesta inmune del huésped. Algunos de estos efectos incluyen la alteración de la expresión y liberación de citocinas. Por ejemplo, PCN provoca una disminución en la secreción de inmunoglobulinas por los linfocitos B, además de que inhibe su proliferación. La toxina también produce apoptosis de neutrófilos y mitiga los mecanismos de defensa mediados por neutrófilos [29].

Como se encuentra representado en la Figura 1. No se observa una diferencia significativa en la producción de este factor de virulencia en particular para las cepas evaluadas, lo cual indica que los TCS RstA/RstB y 4886/4885 probablemente no regulan genes relacionados con la producción de piocianina en *P. aeruginosa* PA14.

El siguiente factor de virulencia evaluado fue la elastasa B (LasB), ésta es la proteasa más abundante secretada por *P. aeruginosa* con un amplio espectro de sustratos de hidrólisis. El sustrato más estudiado de LasB es la elastina, que es un componente clave de los tejidos conectivos que proporciona elasticidad y la capacidad de recuperar la forma después de la contracción o el estiramiento. Otras proteínas estructurales degradadas por LasB son el colágeno y laminina, que son componentes de la matriz extracelular, así como proteínas involucradas en la unión estrecha y la adherencia celular [32].

Además de los componentes estructurales, existen muchos factores circulatorios/inmunitarios que también son degradados por LasB. Estos incluyen inmunoglobulinas, citocinas, quimiocinas, receptores, tensioactivos, componentes del complemento, péptidos antimicrobianos e inhibidores de proteasa [33].

Al analizar la Figura 2, no se observa una diferencia significativa en la producción de este factor de virulencia en particular para las cepas evaluadas, lo cual indica que los TCS RstA/RstB y 4886/4885 probablemente no regulan genes relacionados con la producción de elastasa en *P. aeruginosa* PA14.

Entre la variedad de toxinas extracelulares y enzimas elaboradas por *P. aeruginosa* que podrían contribuir a su patogenicidad, se incluyen 2 hemolisinas. Una de estas hemolisinas es un glicolípido resistente al calor, mientras que la otra es termolábil y se ha identificado como fosfolipasa C (PLC) que cataliza la hidrólisis de la fosfatidilcolina [33]. La mayoría de los aislamientos de *P. aeruginosa* excretan sustancias que pueden lisar los glóbulos rojos in vitro y causar lesiones necróticas cuando se inyectan en la piel de los animales [34].

Como se observa en la Figura 3, se evaluó este factor de virulencia y se observa que no existe una diferencia significativa en la producción de LasB para las cepas de interés. Lo cual indica que los TCS RstA/RstB y 4886/4885 probablemente no regulan genes relacionados con la producción de hemolisina en *P. aeruginosa* PA14.

Una capacidad hemolítica disminuida en las mutantes de RstA y RstB ha sido reportada en *Vibrio alginolyticus*, lo cual no coincide con los resultados obtenidos en la Figura 3, donde no se observa diferencia significativa en los resultados de estas mutantes con la silvestre. Esto se podría deber a la diferencia en microorganismos ya que, aunque son bacilos gram negativos, tienen hemolisinas distintas cuya expresión es regulada de manera diferente [21], [35].

Posteriormente se procedió a evaluar la formación de biopelícula en las cepas, debido a que *P. aeruginosa* es capaz de formar biopelículas en una variedad de superficies vivas y no vivas, como los tapones de moco del pulmón con fibrosis quística, catéteres contaminados y lentes de contacto [25].

Las biopelículas con comunidades bacterianas incrustadas en una matriz de exopolisacáridos (EPS). Se ha demostrado que la matriz del biofilm de *P. aeruginosa* abarca principalmente polisacáridos, ADN extracelular (eDNA), proteínas y lípidos. La matriz, que es responsable de más del 90 % de la biomasa del biofilm, además de proporcionar nutrientes esenciales, enzimas y proteínas citosólicas para la comunidad de biopelículas, la matriz también facilita la comunicación de célula a célula, actúa como un andamio para la adhesión a las superficies y actúa como refugio para las bacterias encerradas en condiciones ambientales adversas [36].

En cuanto a este factor de virulencia, se observa por primera vez una tendencia al realizar los ensayos. La cepa *rstA*⁻ mostró una producción de biopelícula mucho mayor a la cepa silvestre de manera consistente, tanto en los ensayos cualitativos como los cuantitativos. Existe una diferencia significativa, como se observa en la Figura 4, al comparar los datos obtenidos de las cepas y asimismo al comparar la cepa *rstA*⁻ con las RstA pro y RstA ORF que contienen los plásmidos que sobre expresan el gen.

Esta información obtenida coincide con lo reportado para *E.coli* respecto al sistema de dos componentes RstB/RstA, en un estudio donde realizan RNAseq identificaron varios genes de diguanilato ciclasa que son regulados a la alza en la cepa mutante RstA. Estos genes participan en la formación del omnipresente segundo mensajero, cíclico-di-GMP (c-di-GMP), que promueve la formación de biopelículas en muchas bacterias. Asimismo realizaron tinción con cristal violeta donde se observan gráficas con resultados que coinciden con los observados en la Figura 4 [20], [21].

Es probable que en *P. aeruginosa* PA14, el TCS RstB/RstA regule genes relacionados a la formación de biopelícula, ya que la falta del RR RstA provoca una formación de biopelícula significativamente mayor. En cuanto al TCS 4886/4885, no se observaron diferencias significativas en las cepas evaluadas por lo que es probable que este TCS no regule genes relacionados a la formación de biopelícula.

La pioverdina se ha convertido en un objetivo promotor para la intervención terapéutica en infecciones por *P. aeruginosa* ya que es un sideróforo con funciones multifacéticas en la patogénesis. Los sideróforos son moléculas quelantes del hierro solubles en agua que los microorganismos producen como defensa a la restricción de hierro, método clave utilizado por la mayoría de los organismos multicelulares para limitar la infección. La pioverdina, el principal sideróforo producido por *P. aeruginosa*, además de solubilizar el hierro de fuentes inorgánicas, puede liberar este metal de los factores secuestradores de hierro del huésped como la transferrina y de las ferroproteínas residentes en las mitocondrias del huésped [37], [38].

Una vez que ha adquirido hierro, la pioverdina funciona como una molécula de señalización para regular la producción de varias toxinas. Cuando la ferripioverdina se une a su receptor, FpvA, en la membrana externa de la bacteria, se libera un factor sigma alternativo, PvdS, que activa la producción del inhibidor de la traducción Exotoxina A, la proteasa PrpL y los genes responsables de la biosíntesis de pioverdina. La exotoxina A en particular ha sido reconocida como una de las toxinas más potentes secretadas por *P. aeruginosa*, ya que

puede inducir la muerte apoptótica en las células huésped y matar organismos modelo. PrpL (también conocida como proteasa IV) es una proteasa extracelular que degrada los factores del huésped necesarios para la inmunidad de la mucosa pulmonar, como las proteínas surfactantes y la interleucina-22. La producción de pioverdina también promueve la formación de biopelículas de *P. aeruginosa*, lo que es consistente con el paradigma establecido de que la disponibilidad de hierro es necesaria para el desarrollo de biopelículas [23], [24]. Una combinación de estas funciones hace que la producción de pioverdina sea necesaria para la virulencia total de *P. aeruginosa* contra huéspedes mamíferos e invertebrados y debido a esto se decidió investigar si alguno de los TCS de interés regula genes relacionados a este factor [39].

No se observó una diferencia significativa al comparar la producción de piocianina de las cepas mutantes con la silvestre. La sobreexpresión de 4885 RR condujo a una cantidad significativamente menor de pioverdina, lo que sugiere que 4886/4885 puede regular genes relacionados con este sideróforo.

Se administraron a las larvas de *G. mellonella* las cepas y se evaluaron las diferencias en las cepas mutantes de los TCS a evaluar (4886, 4885, *rstA*, *rstB*) y cepas con sobreexpresión del RR (p4885, *prstA*) con la cepa silvestre en cuanto a su capacidad para causar mortalidad.

Tradicionalmente se han utilizado modelos de mamíferos para la investigación en patología, farmacología e inmunología, sin embargo, este tipo de pruebas pueden consumir mucho tiempo, mucho trabajo y ser costosas [40], [41]. Dado el papel de la respuesta inmunitaria innata en la protección de los mamíferos contra la infección microbiana y el alto grado de similitud que existe entre las respuestas inmunitarias innatas de los mamíferos y los insectos, estudiar la respuesta de los insectos a la infección puede proporcionar resultados comparables a los que pueden obtenerse utilizando mamíferos [42]. Es probable que varios factores esenciales para la infección bacteriana, como la adhesión celular, la resistencia a los péptidos antimicrobianos, la degradación de los tejidos y la adaptación al estrés oxidativo, sean importantes tanto en insectos como en mamíferos [43].

La Gran Polilla de la Cera, *G. mellonella*, es comúnmente utilizada como modelo para evaluar la virulencia de una variedad de microorganismos. Las larvas son de color blanco opaco, miden unos 3 cm de largo, pesan entre 0,3 y 0,5 g y sufren una metamorfosis para convertirse en una polilla gris [42]. Se ha demostrado la capacidad estas larvas para detectar diferencias en la patogenicidad de mutantes deficientes en LPS de *P. aeruginosa*

[44], y existe una buena correlación entre la virulencia de *P. aeruginosa* en larvas de *Galleria* y en ratones [42].

Se observa un mayor porcentaje de supervivencia en el grupo administrado con la cepa *P. aeruginosa* PA14 4885 ORF, se encontró diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre mediante la prueba de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Asimismo, se observa que, en el grupo de larvas administrado con la cepa mutante de ese mismo RR 4885, todos los individuos mueren antes de las 25 horas, a diferencia de los grupos administrados con las otras cepas, en donde siempre hay sobrevivientes.

Lo anterior indica que una sobreexpresión del RR 4885 disminuye la virulencia en el microorganismo y permite la supervivencia de los individuos por un tiempo mayor.

Los resultados obtenidos son representados en la siguiente tabla.

Tabla 1. Caracterización de los sistemas de dos componentes RstA/RstB y 4886/4885.

Factor de virulencia	Conclusión
Piocianina	No hay diferencia significativa
Elastasa	No hay diferencia significativa
Hemolisina	No hay diferencia significativa
Biopelícula	Mutante de RstA (RR) produce mayor cantidad de biopelícula
Mortalidad en <i>Galleria mellonella</i>	<u>Sobreexpresión de 4885 (RR)</u> provoca menor mortalidad y la cepa mutante de 4885 provoca mayor mortalidad
Pioverdina	<u>Sobreexpresión de 4885 (RR)</u> provoca la detección de una cantidad menor de pioverdina

Conclusión

Con los resultados anteriores de los fenotipos probados se puede inferir que ambos sistemas RstA/RstB y 4886/4885 están implicados en la virulencia de *P. aeruginosa* UCBPP-PA14.

Perspectivas

- Determinar por RNAseq los genes regulados por 4886/4885 en *P. aeruginosa* UCBPP-PA14.
- Confirmar la regulación 4886/4885 de los genes encontrados mediante la generación de reporteros -lacZ.
- Encontrar la secuencia consenso de la unión del RR de interés y corroborarla mediante ensayos EMSA.
- Definir el regulón completo de este TCS en *P. aeruginosa* UCBPP-PA14.

Referencias

- [1] L. R. Mulcahy, V. M. Isabella, and K. Lewis, "Pseudomonas aeruginosa Biofilms in Disease," *Microb Ecol*, vol. 68, no. 1, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1007/s00248-013-0297-x.
- [2] I. Jurado-Martín, M. Sainz-Mejías, and S. McClean, "Pseudomonas aeruginosa: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 6, p. 3128, Mar. 2021, doi: 10.3390/ijms22063128.
- [3] R. E. Hancock, "The Pseudomonas aeruginosa outer membrane permeability barrier and how to overcome it.," *Antibiot Chemother (1971)*, vol. 36, pp. 95–102, 1985, doi: 10.1159/000410475.
- [4] G. W. Lau, D. J. Hassett, H. Ran, and F. Kong, "The role of pyocyanin in Pseudomonas aeruginosa infection," *Trends Mol Med*, vol. 10, no. 12, pp. 599–606, 2004, doi: 10.1016/j.molmed.2004.10.002.
- [5] E. Potvin *et al.*, "In vivo functional genomics of Pseudomonas aeruginosa for high-throughput screening of new virulence factors and antibacterial targets," *Environ Microbiol*, vol. 5, no. 12, pp. 1294–1308, Dec. 2003, doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00542.x.

- [6] M. Sultan, R. Arya, and K. K. Kim, "Roles of two-component systems in pseudomonas aeruginosa virulence," *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 22, 2021, doi: 10.3390/ijms222212152.
- [7] E. J. Capra and M. T. Laub, "Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems," *Annu Rev Microbiol*, vol. 66, no. 1, pp. 325–347, Oct. 2012, doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150039.
- [8] T. Krell, J. Lacal, A. Busch, H. Silva-Jiménez, M. E. Guazzaroni, and J. L. Ramos, "Bacterial sensor kinases: Diversity in the recognition of environmental signals," *Annu Rev Microbiol*, vol. 64, pp. 539–559, 2010, doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134054.
- [9] A. F. Alvarez, C. Barba-Ostria, H. Silva-Jiménez, and D. Georgellis, "Organization and mode of action of two component system signaling circuits from the various kingdoms of life," *Environ Microbiol*, vol. 18, no. 10, pp. 3210–3226, Oct. 2016, doi: 10.1111/1462-2920.13397.
- [10] F. Padilla-Vaca, V. Mondragon-Jaimes, and B. Franco, "General Aspects of Two-Component Regulatory Circuits in Bacteria: Domains, Signals and Roles," *Curr Protein Pept Sci*, vol. 18, no. 10, Aug. 2017, doi: 10.2174/1389203717666160809154809.
- [11] A. Gómez-Mejía, G. Gámez, and S. Hammerschmidt, "Streptococcus pneumoniae two-component regulatory systems: The interplay of the pneumococcus with its environment," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 308, no. 6, pp. 722–737, Aug. 2018, doi: 10.1016/j.ijmm.2017.11.012.
- [12] S. Tiwari *et al.*, "Two-Component Signal Transduction Systems of Pathogenic Bacteria As Targets for Antimicrobial Therapy: An Overview," *Front Microbiol*, vol. 8, Oct. 2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.01878.
- [13] A. Y. Bhagirath *et al.*, "Two Component Regulatory Systems and Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogens," *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 7, p. 1781, Apr. 2019, doi: 10.3390/ijms20071781.
- [14] R. Gao and A. M. Stock, "Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins," *Annu Rev Microbiol*, vol. 63, no. 1, pp. 133–154, Oct. 2009, doi: 10.1146/annurev.micro.091208.073214.

- [15] M. Goulian, "Two-component signaling circuit structure and properties," *Curr Opin Microbiol*, vol. 13, no. 2, pp. 184–189, 2010, doi: 10.1016/j.mib.2010.01.009.
- [16] A. R. Tierney and P. N. Rather, "Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance," *Future Microbiol*, vol. 14, no. 6, pp. 533–552, Apr. 2019, doi: 10.2217/fmb-2019-0002.
- [17] Y. Gotoh, Y. Eguchi, T. Watanabe, S. Okamoto, A. Doi, and R. Utsumi, "Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria," *Curr Opin Microbiol*, vol. 13, no. 2, pp. 232–239, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.mib.2010.01.008.
- [18] H. Mikkelsen, M. Sivaneson, and A. Filloux, "Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*," *Environ Microbiol*, vol. 13, no. 7, pp. 1666–1681, Jul. 2011, doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02495.x.
- [19] V. I. Francis, E. C. Stevenson, and S. L. Porter, "Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 364, no. 11, Jun. 2017, doi: 10.1093/femsle/fnx104.
- [20] Y. Liu *et al.*, "RstA, a two-component response regulator, plays important roles in multiple virulence-associated processes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7," *Gut Pathog*, vol. 11, no. 1, p. 53, Dec. 2019, doi: 10.1186/s13099-019-0335-4.
- [21] L. Huang, W. Xu, Y. Su, L. Zhao, and Q. Yan, "Regulatory role of the RstB-RstA system in adhesion, biofilm production, motility, and hemolysis," *Microbiologyopen*, vol. 7, no. 5, p. e00599, Oct. 2018, doi: 10.1002/mbo3.599.
- [22] P. H. Celie, A. H. Parret, and A. Perrakis, "Recombinant cloning strategies for protein expression," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 38, pp. 145–154, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.sbi.2016.06.010.
- [23] L. R. Hmelo *et al.*, "Precision-engineering the *Pseudomonas aeruginosa* genome with two-step allelic exchange," *Nat Protoc*, vol. 10, no. 11, pp. 1820–1841, 2015, doi: 10.1038/nprot.2015.115.
- [24] G. M. Coupland, A. M. C. Brown, and N. S. Willetts, "The origin of transfer (oriT) of the conjugative plasmid R46: Characterization by deletion analysis and DNA

- sequencing," *Mol Gen Genet*, vol. 208, no. 1–2, pp. 219–225, Jun. 1987, doi: 10.1007/BF00330445.
- [25] J. Klockgether, N. Cramer, L. Wiehlmann, C. F. Davenport, and B. Tümmler, "Pseudomonas aeruginosa Genomic Structure and Diversity," *Front Microbiol*, vol. 2, 2011, doi: 10.3389/fmicb.2011.00150.
- [26] A. Sánchez-Jiménez, M. A. Llamas, and F. J. Marcos-Torres, "Transcriptional Regulators Controlling Virulence in Pseudomonas aeruginosa," *Int J Mol Sci*, vol. 24, no. 15, p. 11895, Jul. 2023, doi: 10.3390/ijms241511895.
- [27] B. X. Wang, K. C. Cady, G. C. Oyarce, K. Ribbeck, and M. T. Laub, "Two-Component Signaling Systems Regulate Diverse Virulence-Associated Traits in Pseudomonas aeruginosa," *Appl Environ Microbiol*, vol. 87, no. 11, May 2021, doi: 10.1128/AEM.03089-20.
- [28] V. I. Francis, E. C. Stevenson, and S. L. Porter, "Two-component systems required for virulence in Pseudomonas aeruginosa," *FEMS Microbiol Lett*, vol. 364, no. 11, Jun. 2017, doi: 10.1093/femsle/fnx104.
- [29] S. Hall *et al.*, "Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of Pseudomonas aeruginosa," *Toxins (Basel)*, vol. 8, no. 8, pp. 1–14, 2016, doi: 10.3390/toxins8080236.
- [30] P. R. Gardner, "Superoxide Production by the Mycobacterial and Pseudomonad Quinoid Pigments Phthiocol and Pyocyanine in Human Lung Cells," *Arch Biochem Biophys*, vol. 333, no. 1, pp. 267–274, Sep. 1996, doi: 10.1006/abbi.1996.0390.
- [31] T. Das and M. Manefield, "Pyocyanin Promotes Extracellular DNA Release in Pseudomonas aeruginosa," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e46718, Oct. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0046718.
- [32] M. Mateu-Borrás *et al.*, "Molecular Analysis of the Contribution of Alkaline Protease A and Elastase B to the Virulence of Pseudomonas aeruginosa Bloodstream Infections," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 11, Jan. 2022, doi: 10.3389/fcimb.2021.816356.
- [33] C. Cigana *et al.*, "Pseudomonas aeruginosa Elastase Contributes to the Establishment of Chronic Lung Colonization and Modulates the Immune Response in a Murine Model," *Front Microbiol*, vol. 11, Jan. 2021, doi: 10.3389/fmicb.2020.620819.

- [34] J. Ding, S. Lory, and P. C. Tai, "Orientation and expression of the cloned hemolysin gene of *Pseudomonas aeruginosa*," *Gene*, vol. 33, no. 3, pp. 313–321, Jan. 1985, doi: 10.1016/0378-1119(85)90239-2.
- [35] S. Shinoda and S. Miyoshi, "Hemolysins of vibrio cholerae and other vibrio species," in *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, Elsevier, 2006, pp. 748–762. doi: 10.1016/B978-012088445-2/50049-4.
- [36] G. Sharma, S. Rao, A. Bansal, S. Dang, S. Gupta, and R. Gabrani, "Pseudomonas aeruginosa biofilm: Potential therapeutic targets," *Biologicals*, vol. 42, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.biologicals.2013.11.001.
- [37] D. Kang, A. V. Revtovich, Q. Chen, K. N. Shah, C. L. Cannon, and N. V. Kirienko, "Pyoverdine-Dependent Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates From Cystic Fibrosis Patients," *Front Microbiol*, vol. 10, Sep. 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.02048.
- [38] J. M. Meyer, A. Neely, A. Stintzi, C. Georges, and I. A. Holder, "Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*," *Infect Immun*, vol. 64, no. 2, pp. 518–523, Feb. 1996, doi: 10.1128/iai.64.2.518-523.1996.
- [39] D. Kang and N. V. Kirienko, "An In Vitro Cell Culture Model for Pyoverdine-Mediated Virulence," *Pathogens*, vol. 10, no. 1, p. 9, Dec. 2020, doi: 10.3390/pathogens10010009.
- [40] D. Romera *et al.*, "The *Galleria mellonella* infection model as a system to investigate the virulence of *Candida auris* strains," *Pathog Dis*, vol. 78, no. 9, Nov. 2020, doi: 10.1093/femspd/ftaa067.
- [41] S. Magdeldin and A. Moser, "Affinity Chromatography: Principles and Applications," *Affinity Chromatography*, no. May, 2012, doi: 10.5772/39087.
- [42] K. Kavanagh and E. P. Reeves, "Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens," *FEMS Microbiol Rev*, vol. 28, no. 1, pp. 101–112, Feb. 2004, doi: 10.1016/j.femsre.2003.09.002.
- [43] N. Ramarao, C. Nielsen-Leroux, and D. Lereclus, "The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis," *Journal of Visualized Experiments*, no. 70, Dec. 2012, doi: 10.3791/4392.

- [44] G. B. Dunphy, D. B. Morton, A. Kropinski, and J. M. Chadwick, "Pathogenicity of lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa* for larvae of *Galleria mellonella*: Bacterial properties associated with virulence," *J Invertebr Pathol*, vol. 47, no. 1, pp. 48–55, Jan. 1986, doi: 10.1016/0022-2011(86)90162-X.