



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

TESIS

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GENES *chr* DEL
PLÁSMIDO pUM505 EN LA VIRULENCIA DE
Pseudomonas aeruginosa

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL

PRESENTA:
Q.F.B. BRENDA VALERIO ARELLANO
1505677X

ASESORA:
D.C. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ

MORELIA, MICHOACÁN; Junio 2026.



UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Cuna de héroes, crisol de pensadores

El presente proyecto de tesis ha sido realizado en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Con apoyo de la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación y de la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.

Ciencia y Tecnología

**Secretaría de Ciencia, Humanidades,
Tecnología e Innovación**



Índice

I. Introducción.....	1
1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2 Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	2
1.3 <i>Quorum sensing</i> de <i>P. aeruginosa</i>	4
II. Antecedentes.....	9
III. Justificación.....	16
IV. Hipótesis.....	16
V. Objetivos.....	17
VI. Estrategia experimental.....	18
VII. Material y métodos.....	19
7.1 Medios de cultivo.....	19
7.2 Cepas empleadas.....	19
7.3 Plásmidos y vectores empleados.....	20
7.4 Oligonucleótidos empleados.....	20
7.5 Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	21
7.6 Aislamiento de DNA plasmídico por el método de Casse.....	21
7.7 Amplificación por PCR.....	24
7.8 Electroforesis en gel de agarosa.....	24
7.9 Preparación de células competentes.....	25
7.10 Transformación por el método de electroporación.....	25
7.11 Pruebas de susceptibilidad en medio líquido.....	26
7.12 Virulencia en el modelo de nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
7.13 Ensayos de toxicidad en el modelo del nematodo <i>C. elegans</i>	26
VIII. Resultados.....	28
8.1 Amplificación mediante PCR de los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> , <i>chrAC</i> y <i>chrC</i> del plásmido pUM505.....	28
8.2 Pruebas de susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> , <i>chrC</i> y <i>chrAC</i> (<i>chrA</i> y <i>chrC</i>).....	28
8.3 Virulencia conferida por el gen <i>chrA</i> sobre la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1...	31

8.4 Toxicidad del sobrenadante de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en presencia del gen <i>chrA</i>	31
8.5 Evaluación de la expresión del gen <i>chrA</i> en la susceptibilidad de dicromato de potasio en medio mínimo (M9).....	33
8.6 Determinación de la virulencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con el gen <i>chrA</i> adicionando cianuro de potasio.....	36
8.7 Evaluación de la virulencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con el gen <i>chrA</i> adicionando N- acetilcisteína	38
8.8 Determinación de la virulencia de los genes <i>chr</i> en la cepa <i>E. coli</i> JM101.....	38
8.9 Susceptibilidad a cromato de la cepa de <i>P. aeruginosa lasl/rhlI</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i> del plásmido pUM505.....	41
8.10 Virulencia de la cepa de <i>P. aeruginosa lasl/rhlI</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	41
8.11 Toxicidad del sobrenadante de las cepas <i>P. aeruginosa lasl/rhlI</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	43
8.12 Susceptibilidad a cromato de las mutantes de <i>P. aeruginosa lasl</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	46
8.13 Susceptibilidad a cromato de la cepa de <i>P. aeruginosa lasl/rhlI</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	46
8.14 Efecto del tratamiento con proteasas en la toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. aeruginosa lasl/rhlI</i> con el gen <i>chrA</i>	49
8.15 Efecto del tratamiento con calor en la toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. aeruginosa lasl/rhlI</i> con el gen <i>chrA</i>	52
IX. Discusión	54
X. Conclusión	62
XI. Bibliografía	63

Índice De Figuras

Figura 1. Estructura general de las acil homoserín lactonas (AHLs).....	6
Figura 2. Estructura de las acil homoserín lactonas del sistema de QS en <i>P. aeruginosa</i>	7
Figura 3. Mecanismo general del sistema de QS en <i>P. aeruginosa</i>	8
Figura 4. Mapa genético del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i>	10
Figura 5. Virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y PAO1 (pUM505) en un modelo de infección de hojas de lechuga.....	12
Figura 6. Arreglo genómico de los <i>orfs</i> 90 al 94 del plásmido pUM505.....	14
Figura 7. Mecanismo de expulsión del cromato por la proteína ChrA del plásmido pUM505.....	15
Figura 8. Amplificación mediante PCR de los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> , <i>chrAC</i> y <i>chrC</i> de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.....	29
Figura 9. Curva de susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> , <i>chrC</i> y <i>chrAC</i> (<i>chrA</i> y <i>chrC</i>).....	30
Figura 10. Virulencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	32
Figura 11. Evaluación de la toxicidad de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	34
Figura 12. Susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con <i>chrA</i> en medio mínimo (M9).....	35
Figura 13. Virulencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con el gen <i>chrA</i> adicionando cianuro de potasio.....	37
Figura 14. Virulencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> que expresan al gen <i>chrA</i> crecidas en presencia de NAC.....	39
Figura 15. Susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>E. coli</i> JM101 con genes <i>chr</i>	40
Figura 16. Evaluación de la participación de los genes <i>chrA</i> y <i>chrB</i> en la virulencia de <i>E. coli</i> JM101.....	42
Figura 17. Curvas de susceptibilidad a cromato de la cepa de <i>P. aeruginosa lasI/rhlI</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	44
Figura 18. Ensayo de virulencia de la cepa de <i>P. aeruginosa lasI/rhlI</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	45
Figura 19. Toxicidad del sobrenadante de las cepas <i>P. aeruginosa lasI/rhlI</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	47
Figura 20. Evaluación de la susceptibilidad a cromato de los genes <i>chr</i> en la cepa mutante de <i>P. aeruginosa lasI</i>	48
Figura 21. Ensayo de virulencia de la cepa de <i>P. aeruginosa lasI</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chrB</i> y <i>chrC</i>	50

Figura 22. Evaluación de la toxicidad de los sobrenadantes tratados con proteasas de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>P. aeruginosa lasl/rhlI</i> con el gen <i>chrA</i>	51
Figura 23. Toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> y <i>P.aeruginosa lasl/rhlI</i> con el gen <i>chrA</i> tratado con calor.....	53

Índice De Tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de los genes del operón <i>chr</i> (<i>orf</i> 90-92).....	22
Tabla 2. Condiciones empleadas para la amplificación de los <i>orfs</i> 90, 91 y 92 por PCR.....	23

Resumen

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo suelo y agua, así como en asociación con varios organismos vivos y es fuente de infecciones oportunistas en humanos. En *P. aeruginosa* múltiples factores de virulencia implicados en la infección aguda y daño de la célula huésped son regulados por los sistemas de Quorum sensing (QS) Las y Rhl. Nuestro grupo de trabajo determinó que la transferencia del plásmido pUM505 aumenta la virulencia de la cepa de referencia de *P. aeruginosa* PAO1 tanto en el modelo de hoja de lechuga como en ratón, aunado a que aumentó la citotoxicidad de esta cepa hacia las células HeLa. Por lo que se generó una biblioteca de genes del plásmido pUM505 clonados en el vector pUCP20 para identificar los genes relacionados con la virulencia. La clona *P. aeruginosa* PAO1 Ps-EH26 posee los *orfs* 92, 93 y 94, los cuales codifican a un regulador transcripcional ChrB, una probable resolvasa tipo TnpR y una transposasa tipo TnpA, respectivamente; proteínas que a nuestro conocimiento no han sido relacionadas previamente con virulencia. Sin embargo, el análisis *in silico* de los *orfs* del plásmido pUM505 sugiere que el *orf* 92 forma parte de un operón en conjunto con los *orfs* 90 y 91 que corresponden a los genes *chrC* y *chrA*, respectivamente. El *orf*90 codifica a una proteína que posee identidad con proteínas superóxido dismutasas, mientras que el *orf*91 a una proteína de resistencia a cromato (ion tóxico), ampliamente estudiada en la resistencia a este metal. Mediante ensayos de virulencia empleando el modelo de *Caenorhabditis elegans* se determinó que la proteína codificada por el *orf*91 aumenta la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, además que no está siendo regulado por QS.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, pUM505, ChrA, virulencia, Quorum Sensing.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative bacterium widely distributed in the environment, including soil and water, as well as in association with various living organisms and is a source of opportunistic infections in humans. In *P. aeruginosa* multiple virulence factors involved in acute infection and host cell damage are regulated by the *Quorum sensing* (QS) Las and Rhl systems. Our work group determined that the transfer of the plasmid pUM505 increases the virulence of the reference strain of *P. aeruginosa* PAO1 in both the lettuce leaf model and in mice, and increased the cytotoxicity of this strain towards HeLa cells. Therefore, a gene library was generated from the pUM505 plasmid cloned into the pUCP20 vector to identify virulence-related genes. *P. aeruginosa* PAO1 Ps-EH26 clone has *orfs* 92, 93 and 94, which encode a transcriptional regulator ChrB, a probable TnpR-like resolvase and a TnpA-like transposase, respectively; proteins that to our knowledge have not been previously related to virulence. However, *in silico* analysis of the pUM505 *orfs* suggests that *orf* 92 is part of an operon together the *orfs* 90 and 91 corresponding to the *chrC* and *chrA* genes, respectively. *Orf* 90 encodes a protein that has identity with superoxide dismutase proteins, while *orf* 91 encodes a chromate (toxic ion) resistance protein, widely studied in the resistance to this metal. Through virulence assays using the *Caenorhabditis elegans* model, it was determined that the protein encoded by *orf* 91 increases the virulence of *P. aeruginosa* PAO1, and that it is not being regulated by QS.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, pUM505, ChrA, virulence, Quorum Sensing.

I. Introducción

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, considerada como un patógeno oportunista, con forma de bastón, móvil por la presencia de un flagelo polar, pertenece a la rama de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias (Pace y col., 1997; Qin y col., 2022). Se encuentra en diferentes ambientes como: suelos, ríos, lagos y plantas. Se ha demostrado que puede sobrevivir en ambientes inhóspitos tales como jabón, soluciones de clorhexidina e incluso en combustible para aviones. Esto se debe a que necesita requerimientos nutricionales mínimos, también es capaz de tolerar diversos medios físicos, por ejemplo, temperaturas elevadas y concentraciones bajas de oxígeno (Hardalo y Edberg, 1997; Diggle y Whiteley, 2020).

P. aeruginosa es capaz de generar infecciones crónicas debido que presenta con un amplio repertorio de factores de virulencia y una compleja red de señales regulatorias tanto intracelulares como extracelulares, que permiten a la bacteria adaptarse y así escapar de las defensas del huésped (Sinha y col., 2022). Además, esta bacteria tiene la capacidad de emplear los mismos determinantes de virulencia para poder infectar diferentes hospederos (Fajardo y col., 2008).

Esta bacteria es un patógeno oportunista tanto de animales, plantas y humanos, y en este último es causante de diversas infecciones, como de infecciones agudas (infecciones en el tracto urinario, en heridas) y crónicas (infecciones respiratorias en personas que presentan fibrosis quística) (Battle y col., 2008). *P. aeruginosa* es considerada como uno de los principales patógenos oportunistas, causando diversas infecciones intrahospitalarias. Por lo cual en 2017 la OMS la incluyó a un grupo de patógenos denominado como “ESKAPE”, acrónimo, formado por la inicial de cada uno de los patógenos que lo conforma: *Enterococcus faecium*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* y *Enterobacter* (Santajit y Indrawattana, 2016).

La cepa de *P. aeruginosa* PAO1, aislada de una herida, fue la primera cepa de *P. aeruginosa* en ser secuenciada y es una cepa de referencia ampliamente utilizada en el laboratorio (Holloway, 1955). Se logró concluir la secuencia completa de su genoma en el año 2000 el cual posee un único cromosoma que consta de 6.3 millones de pares de bases, con un total de 5,570 marcos de lectura abiertos (Stover y col., 2000). La información sobre su genoma se está actualizando constantemente, ampliando su contenido y funcionalidad de la base de datos y así acelerando el descubrimiento de potenciales blancos farmacológicos (Klockgether y col., 2010).

1.2 Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es considerada una de las bacterias causante del mayor porcentaje de infecciones intrahospitalarias, gracias a que presenta una gran variedad de factores de virulencia los cuales facilitan la invasión tisular y la diseminación sistémica. Algunos factores que posee son: pilis, flagelos, endotoxinas, exotoxinas y factores de permeabilidad vascular (Rahme y col., 2000).

- **Flagelo**

P. aeruginosa presenta un flagelo el cual le aporta movilidad; esta estructura celular le provee a la proteína flagelar FliD, la cual además le confiere a la bacteria la capacidad de adhesión a mucosas de la vía respiratoria (Arora y col., 2001). Este flagelo posee a FliC, una proteína responsable de secretar péptidos antimicrobianos al sistema inmunológico, lo que posteriormente ocasiona muerte celular piroptótica (muerte celular por la infección de patógenos) por la vía NFκB (Kipnis y col., 2006; Bouteiller y col., 2022).

- **Pili**

La bacteria presenta un pili tipo IV, el cual ayuda a la bacteria a adherirse a las células del huésped, de esta manera induce el daño y diseminación de la bacteria,

además de que esta estructura celular participa en la formación de biopelículas (Persat y col., 2015).

- **Alginato**

P. aeruginosa produce alginato, un exopolisacárido constituido por unidades de ác. D-manurónico y ác. L-glucorónico. Esta molécula es importante para la formación de la biopelícula, contribuyendo al aumento de la resistencia a los antibióticos (Chung y col., 2023). Cuando el alginato es producido en exceso por las bacterias, estas son denominadas mucoides. Las cepas de *P. aeruginosa* productoras de alginato presentan alta persistencia de las infecciones y una rápida degradación de la función pulmonar lo que se relaciona con las infecciones en pacientes con fibrosis quística (Faezi y col., 2017).

- **Sistemas de secreción**

P. aeruginosa cuenta con diferentes sistemas los cuales se especializan en la secreción de moléculas a través de las membranas (Henderson y col., 2004). En las bacterias han sido identificados seis tipos de secreción, en los que su composición y la naturaleza propia de estos complejos están altamente conservados en bacterias que son Gram-negativas (Hachani y col., 2011). En *P. aeruginosa* se encuentran cinco tipos de sistemas de secreción, de los cuales tres son de mayor importancia. El sistema de secreción tipo II secreta a las elastas; LasA y LasB, que inhiben a las barreras físicas de las células huésped destruyendo el colágeno y facilitando la infección (Vetrivel y col., 2021). Una variedad de toxinas como Exo A, Exo T, Exo S, Exo U y Exo son secretadas por el sistema de secreción tipo III (SST3) (Chung y col., 2009). El sistema de secreción tipo V, es responsable de secretar piocianina, una fenazina color azul verdoso, el cual produce disfunción ciliar en el tracto respiratorio e interrumpe la cadena transportadora de electrones de las mitocondrias, lo cual provoca daño celular e inflamación (Al-Wrafy y col., 2023).

Además, múltiples factores de virulencia son regulados por el entorno y las condiciones nutricionales de la bacteria; un ejemplo de esto es que la disponibilidad de fosfato que regula la producción de la fosfolipasa C una enzima que hidroliza los fosfolípidos (Pritchard y col., 1986; Shortridge y col., 1992). La concentración de hierro que se encuentra disponible en el medio de crecimiento regula a la producción de la exotoxina A, una toxina secretada por *P. aeruginosa* que provoca la muerte celular al detener la producción de proteínas esenciales; además el hierro regula la síntesis de las elastasas (LasA y LasB), las cuales realizan la degradación de la elastina, una proteína clave en tejidos como los pulmones y vasos sanguíneos, lo que puede causar daño tisular y hemorragia (Grant y Vasil, 1986; Iglewski y col., 1990). La producción de un gran número de expoproduitos (elastasas, proteasa alcalina, proteasa LasA, hemolisisna, piocianina y ramnolípidos) son dependientes de la densidad celular y regulados por el sistema de “*Quorum sensing*” (Pesci e Iglewski, 1997).

1.3 *Quorum sensing* de *P. aeruginosa*

“*Quorum sensing*” (QS), es un término, el cual describe a los sistemas de comunicación intercelular que son dependientes de la población bacteriana (Diggle y col., 2007). Por medio de moléculas difusibles se puede lograr la comunicación célula a célula, esto permite que las bacterias desarrollen respuestas coordinadas, logrando resultados que de otro modo resultarían imposibles para una única célula (Jiménez y col., 2012). Las moléculas difusibles en Gram negativas se conocen como acil homoserín lactonas (AHLs) y en bacterias Gram positivas es mediado por pequeños péptidos (AIP) (Rojas y col., 2011). Las AHL (**Figura 1**) son moléculas que consisten de un anillo lactona hidrofílico y una cadena acilo hidrofóbica que puede consistir de diferentes longitudes. Poseen propiedades químicas diversas y están relacionadas en el control de la expresión de genes de metabolitos secundarios, transferencia de plásmidos, bioluminiscencia, motilidad, formación de

biofilm, proteasas, elastasas, swarming y piocianina (Shah y col., 2022; Diggle y col., 2007).

El QS es considerado un importante sistema de regulación en el control de la patógenesis de *P. aeruginosa* (Toyofuku y col., 2007). En *P. aeruginosa* han sido identificados dos sistemas de QS; los cuales sintetizan las acilhomoserín lactonas N-3-oxo-dodecanoyl-homoserín lactona (3OC12-HSL) y N-butanoyl-L-homoserín lactona (C4-HLS) (Shah y col., 2019) (**Figura 2**).

El sistema Las produce y responde al primer autoinductor (3OC12-HSL) que es una molécula producida por la sintasa LasI y es reconocida por el regulador transcripcional LasR (Rampioni y col., 2007). Este sistema controla múltiples factores de virulencia como LasA, LasB, exotoxina A y proteasa alcalina, que están involucrados en infecciones agudas y en el daño a las células del huésped (Jones y col., 1993; Gambello y col., 1993).

El sistema Rhl sintetiza y responde al segundo autoinductor (C4-HLS) (Pearson y col., 1995) que es generado por la sintasa RhII. Para que el autoinductor sea reconocido por el regulador transcripcional RhlR, se forma un complejo que regula la expresión de varios genes responsables de la producción de factores de virulencia (Bleves y col., 2005). Ambos sistemas Las y Rhl se correlacionan entre sí, el sistema Las controla al sistema Rhl, ya que el complejo 3-oxo-C₁₂-HSL-LasR regula directamente la transcripción de RhlR (Waters y Bassler, 2005) (**Figura 3**).

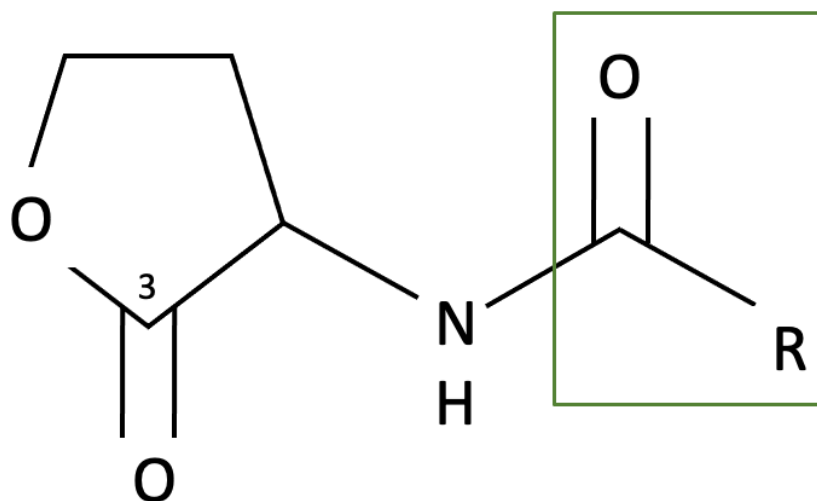


Figura 1. Estructura general de las acil homoserín lactonas (AHLs). Se presenta la cadena R-acilo (recuadro verde) puede variar de 4 a 18 átomos de carbono. Puede haber un grupo carbonilo o un grupo hidroxilo en el átomo C3 y/o uno o más dobles enlaces en la cadena de acilo. (Modificado de Foresto y Bogino, 2020).

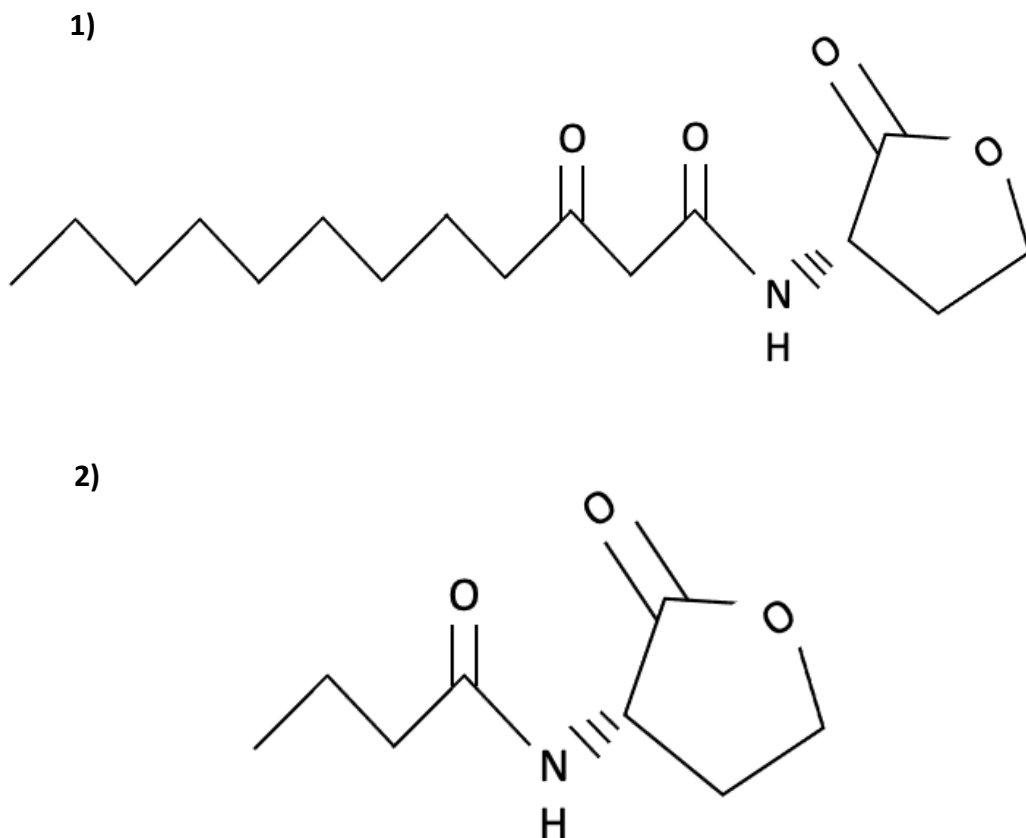


Figura 2. Estructura de las acil homoserín lactonas del sistema de QS en *P. aeruginosa*. Se muestran las estructuras de las AHL producidas por QS en *P. aeruginosa*. **1)** El primer autoinductor producido es N-3-oxo-dodecanoyl-homoserín lactona (3-oxo-C12-HSL). **2)** Se muestra el segundo autoinductor producido N-butanoyl-L-homoserín lactona (C4-HLS) (Modificado de Mayank y col., 2019).

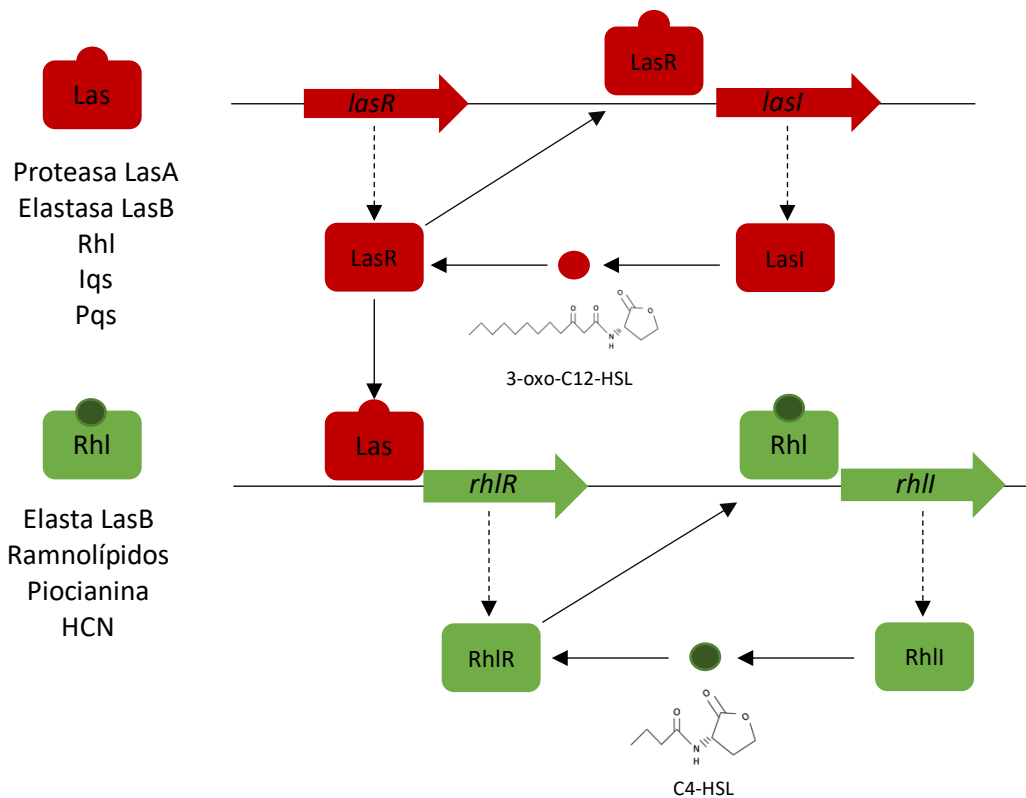


Figura 3. Mecanismo general del sistema de QS en *P. aeruginosa*. Se muestran los sistemas Las y Rhl de QS en *P. aeruginosa*. El autoinductor 3-oxo-C12-HSL es producido y secretado, al alcanzar en el exterior una concentración umbral e forma el complejo 3-oxo-C12-HSL-LasR, el cual se une a las regiones promotoras de múltiples genes activando o reprimiendo su transcripción. Entre los genes regulados positivamente por este complejo son *lasI*, el cual aumenta la producción de LasI (como efecto de autoinducción), por otro lado, *rhIR* aumenta la producción de RhlR, que a su vez es el regulador transcripcional de *rhII*, produciendo RhII, lo que conlleva a la producción de C4-HLS. Al lado izquierdo de la figura se muestran algunos de los factores de virulencia que son regulados por cada sistema QS (Modificado de Waters y Bassler, 2005; Jiménez y col., 2012).

II. Antecedentes

El plásmido pUM505 es un plásmido conjugativo, aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado de un hospital de Morelia, Michoacán. Se determinó que es capaz de conferir resistencia a cromato y mercurio (Cervantes y Ohtake, 1988). Ramírez-Díaz y col. llevaron a cabo la secuenciación y el análisis del plásmido pUM505, determinando que es un replicón circular que posee 123, 322 pares de bases (pb) y que presenta 138 regiones codificantes (*orfs*), de los cuales 64 codifican a proteínas con función desconocida (proteínas hipotéticas, PH), 15 codifican a elementos móviles, 13 están relacionados con transferencia, 13 con resistencia a metales pesados, 13 con metabolismo y 5 con regulación transcripcional de genes, entre otros (**Figura 4**) (Ramírez-Díaz y col., 2011).

El plásmido pUM505 presenta dos regiones bien definidas correspondientes a Islas Genómicas (IG), una IG conocida como isla de patogenicidad (PAI) con un tamaño de ~67 kb en la cual se localizan genes cuyos productos participan en la virulencia; la segunda región, de ~31 kb, que corresponde a una IG que contiene a los genes de resistencia a metales pesados como mercurio o cromato (**Figura 4**) (Ramírez-Díaz y col., 2011). El plásmido pUM505 es capaz de incrementar la virulencia de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 en ratón y hoja de lechuga, además de que aumentó la citotoxicidad de esta cepa hacia las células HeLa (**Figura 5**), indicando que el plásmido pUM505 posee genes que codifican a factores que estén implicados en la virulencia de *P. aeruginosa*.

Empleando una biblioteca de genes del plásmido pUM505 clonados en el vector pUCP20 se identificaron los plásmidos recombinantes pEH8, pEH24 y pEH26 que al ser trasfireridos a las cepas de *E. coli* TOP10 y *P. aeruginosa* PAO1 incrementaron la virulencia de las bacterias en hojas de lechuga, generando un mayor daño en los tejidos de las plantas; aumentaron la virulencia en ratones; así como también aumentaron la citotoxicidad en células HeLa (Rodríguez-Andrade y col., 2016).

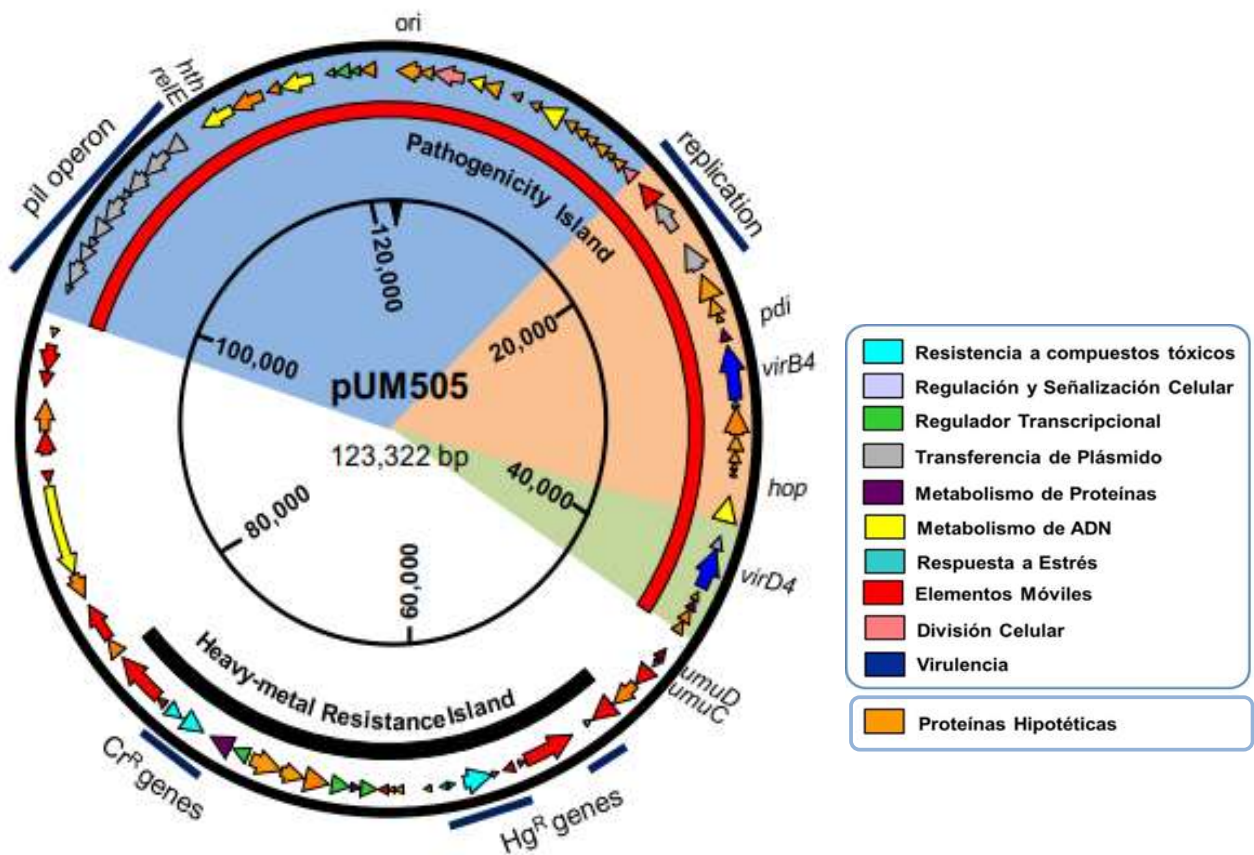


Figura 4. Mapa genético del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Las regiones codificantes se muestran con flechas o puntas de flecha, indicando la dirección de la transcripción. Las posibles funciones asignadas de las proteínas codificantes se agrupan de acuerdo a los diferentes colores mostrados en el cuadro de la derecha, indicando también las proteínas hipotéticas (PH). La isla de patogenicidad (PAI) se muestra con una barra roja y la isla de resistencia a metales pesados con una barra negra. Se indica el origen de replicación (ori) y con barras azules las regiones relacionadas con la transferencia, replicación, resistencia a mercurio (Hg^R) y resistencia a cromato (Cr^R). Los bloques de estructura de mosaico se representan como regiones de colores azul, naranja y verde (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).

La clona pEH26 fue la que mostró el mayor incremento en la virulencia tanto en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y en *E. coli* TOP10 (Ramírez-Díaz y col., 2011; Rodríguez-Andrade y col., 2016). El plásmido recombinante pEH26 presente en la clona H26 contiene a los *orfs* 92, 93 y 94 que están localizados en la GI de resistencia a metales del plásmido pUM505. El *orf* 92 (*chrB*) codifica a la proteína ChrB, con un tamaño de 325 aminoácidos (aa), el cual es el regulador transcripcional del operón *chr*. El *orf* 93 presente en el plásmido pEH26 codifica a la proteína TnpR, una probable resolvasa de 185 aa, mientras que el *orf* 94 codifica para una probable transposasa tipo TnpA. Estas proteínas no han sido previamente involucradas con la virulencia (Rodríguez-Andrade y col., 2016).

Por otro lado, el *orf* 92 es codificado en forma de operón en conjunto con los *orfs* 90 y 91 (**Figura 6**) (Ramírez-Díaz y col., 2011; Rodríguez-Andrade y col., 2016). Estos genes conforman al operón *chr* el cual posee al gen *chrA* (*orf* 91) que codifica a la proteína de membrana ChrA que es un sistema de expulsión altamente caracterizado que confiere resistencia a cromato (Alvarez-Alvarez y col., 1999). El operón *chr* (**Figura 6**) está conformado por el *orf* 90 que codifica a la proteína ChrC, de un tamaño de 86 aa. La proteína ChrC posee identidad con la región amino terminal de proteínas superóxido dismutasa, las cuales son proteínas con un tamaño promedio de 197-199 aa (Díaz-Magaña, 2006), lo que sugiere que esta proteína esta trunca y por lo tanto no es funcional. El *orf* 91, como fue descrito previamente, codifica para la proteína ChrA, la cual presenta un tamaño de 416 aa, siendo la primera proteína en ser estudiada y reportada como un sistema específico de expulsión a cromato. ChrA pertenece la superfamilia de proteínas CHR, la cual incluye a cientos de probables homólogos en todos los dominios. El *orf* 92 codifica a la proteína ChrB, de un tamaño de 296 aa, la cual presenta similitud con las proteínas ChrB del plásmido pMOL28 y pB4, ChrB que participa en la regulación de la expresión del transportador ChrA (Ramírez-Díaz y col., 2011; Rodríguez-Andrade y col., 2016).

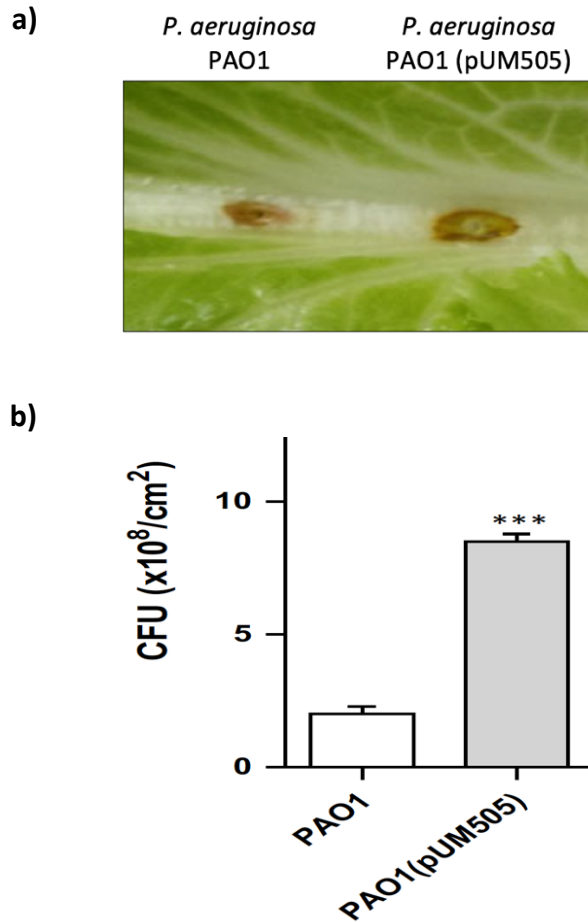


Figura 5. Virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 y PAO1 (pUM505) en un modelo de infección de hojas de lechuga. a) Se muestran las áreas de lesión generadas por las cepas que fueron inoculadas en la nervadura central de una hoja de lechuga sana. b) Se muestran las unidades formadoras de colonias (UFC) cuantificadas de las áreas de lesión de las hojas de lechuga infectadas con las cepas bacterianas. Los datos representan la media de seis experimentos independientes con la desviación estándar (DE) mostrada. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (PAO1) están indicadas por *** $P \leq 0.001$ (Prueba de Tukey) (modificado de Rodríguez y col., 2016).

La resistencia a cromato conferido por la proteína ChrA se debe a un mecanismo de expulsión de los iones cromato, siendo uno de los mecanismos de resistencia cromato que mejor han sido caracterizados (Cervantes y col., 1990, Ramírez-Díaz y col., 2008). El mecanismo se basa en que la proteína ChrA actúa como una bomba quimiostática, la cual expulsa a los oxianiones de cromato del citoplasma hacia el periplasma, utilizando el potencial electroquímico de membrana como fuente de energía (**figura 7**) (Álvarez y col., 1999).

Sin embargo, a la fecha no hay reportes acerca de que alguno de los genes *chr* esté involucrado en el aumento de virulencia de *P. aeruginosa*; por lo que es de interés dilucidar el papel de los genes de *chr* y su regulación por el sistema de QS.

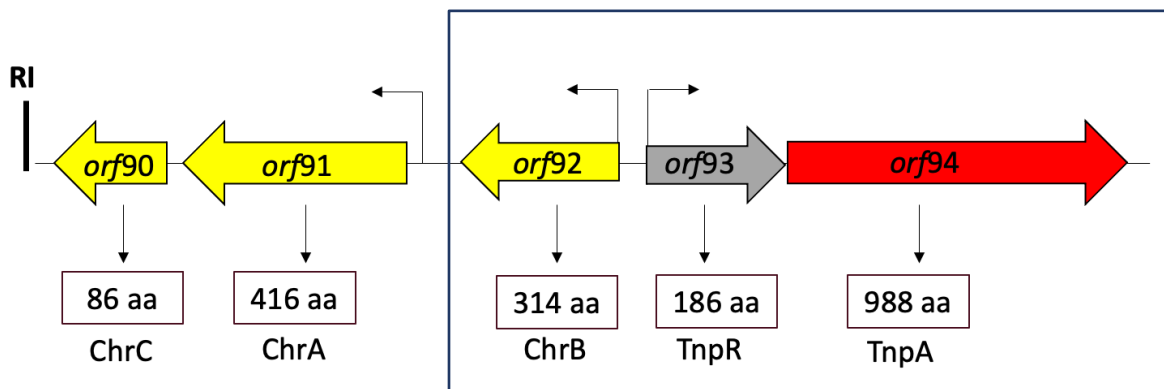


Figura 6. Arreglo genómico de los *orfs* 90 al 94 del plásmido pUM505. Las flechas color amarillo representan a los *orfs* 90, 91 y 92, que codifican para las proteínas ChrC, ChrA y ChrB respectivamente. Los cuales pertenecen al operón *chr*. Los *orfs* que están adentro del recuadro pertenecen a los *orfs* del plásmido recombinante pEH26.

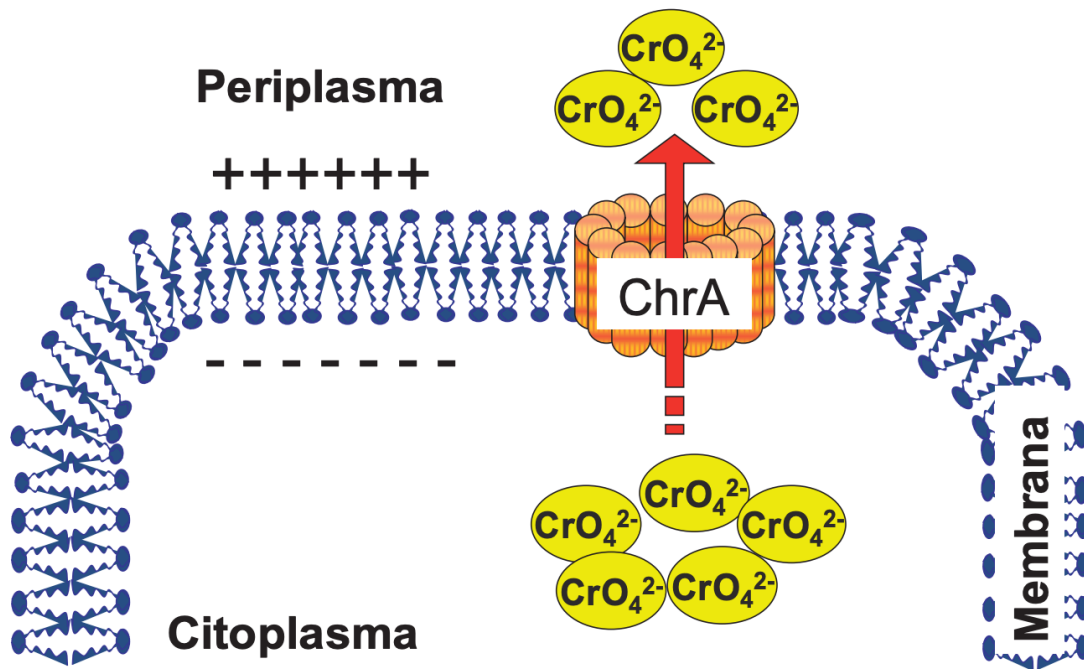


Figura 7. Mecanismo de expulsión del cromato por la proteína ChrA del plásmido pUM505. La proteína de membrana ChrA funciona expulsando iones cromato (CrO_4^{2-}) del citoplasma hacia el espacio periplásmico, esto se debe a que usa como fuente de energía al potencial de membrana (modificado de Pimentel y col., 2002).

III. Justificación

La clona de *P. aeruginosa* EH26, que posee a los *orfs* 92, 93 y 94 del plásmido pUM505, los cuales codifican al regulador ChrB, a una proteína tipo TnpR y a una proteína tipo TnpA, respectivamente, muestra mayor virulencia que la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1. El *orf* 92 forma parte del operón *chr* en conjunto con los *orfs* 90 y 91 del plásmido pUM505. Se ha descrito que el operón *chr* participa en la resistencia a cromato, la proteína ChrA (codificada por el *orf*91) es una proteína que se encuentra distribuida y ha sido ampliamente caracterizada como un sistema de expulsión de cromato. Sin embargo, se desconoce la función de las proteínas codificadas por el operón *chr* en la virulencia de *P. aeruginosa*. Por lo que es de interés determinar la participación de los productos del operón *chr* en la virulencia de *P. aeruginosa*, así como establecer si son regulados por el sistema de QS.

IV. Hipótesis

El incremento de la virulencia de la clona de *P. aeruginosa* EH26 es generado por la presencia del *orf*92 del plásmido pUM505, que en conjunto con los *orfs* 90 y 91 forman un operón que codifica a factores de virulencia de *P. aeruginosa* regulados por QS.

V. OBJETIVOS

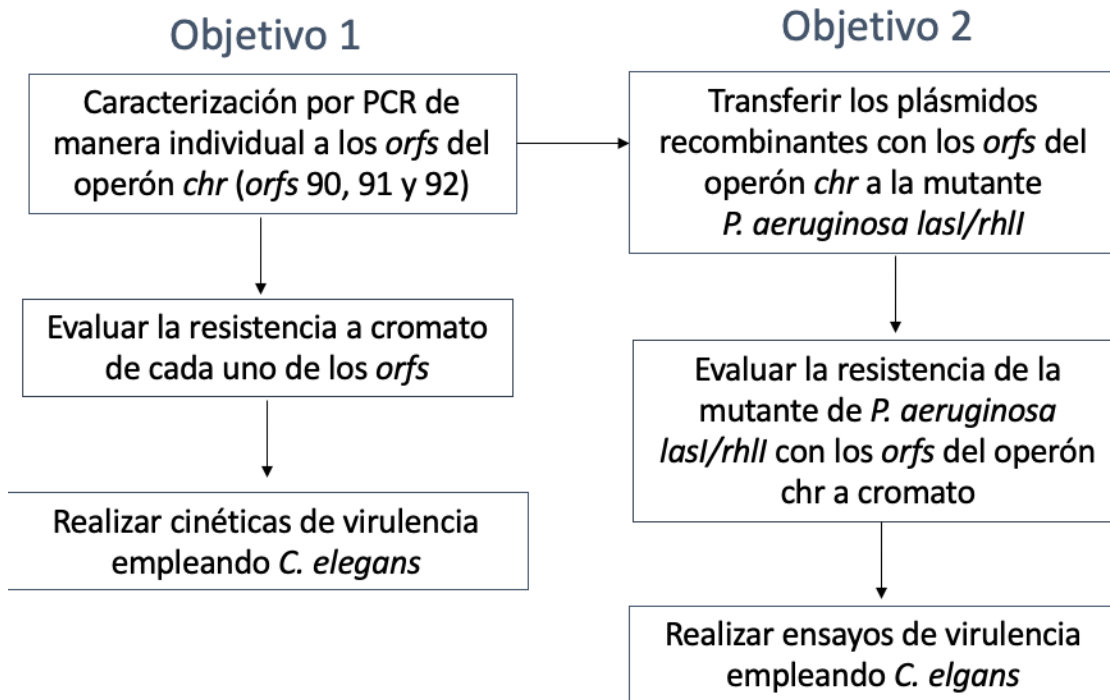
a) Objetivo general

Determinar el papel de los *orfs* 90, 91 y 92 (operón *chr*) del plásmido pUM505 en la virulencia de *P. aeruginosa* y su regulación por el sistema de QS.

b) Objetivos específicos

1. Evaluar la participación de los *orfs* 90, 91 y 92 en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1.
2. Determinar la participación de los sistemas Las y Rhl del QS en la regulación de la virulencia y resistencia a cromato conferida por el operón *chr*.

VI. Estrategia experimental



VII. Materiales y métodos

7.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron:

- I. Caldo Luria Bertani (CL): NaCl (J.T. Baker) 1%, peptona de caseína (Bioxon) 1% y extracto de levadura (Becton Dickinson) 0.5%.
- II. Agar Luria Bertani (AL): al CL se le agregó 1.5 % de agar bacteriológico (Bioxon).
- III. Caldo nutritivo (CN): peptona de gelatina 0.5 % y extracto de carne de res 0.3% (Bioxon).
- IV. Agar nutritivo (AN): al CN se le agregó 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon).
- V. Medio de cultivo M9 (M9): sales minerales M9 (Sigma), glucosa 20 mM, $\text{CaCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM y $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2mM (Sambrock y col., 1989).

7.2 Cepas empleadas

- 1) *P. aeruginosa* PAO1 (colección de la Dra. Iglewski's) (Li y col., 2007). Se empleó como cepa control en los ensayos de resistencia a cromato y de virulencia.
- 2) *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505). Cepa que se utilizó para obtener el DNA molde para la amplificación por PCR de los *orfs* 90,91 y 92. Resistente a Cr^R , Hg^R . Utilizada como control positivo de ensayos de resistencia a cromato y en ensayos de virulencia.
- 3) *E. coli* JM101 (F^- , traD36, proAB, lacIqDM15), thi, D (lac-proAB) (Yanisch-Perron y col., 1985). Cepa empleada como receptora de los plásmidos recombinantes derivados del vector pUCP20.
- 4) *P. aeruginosa lasI/rhlI*. Cepa mutante en los genes *lasI* y *rhlI* que codifican a las proteínas productoras de las moléculas autoinductoras del QS, fue empleada como receptora de los plásmidos recombinantes de los *orfs* del operón *chr*, altamente sensible a cromato.

- 5) *P. aeruginosa* PAO1 *lasI*. Cepa que contiene una mutación sencilla en el gen *lasI* que sintetiza al autoinductor LasI del QS. Cepa empleada como receptora de los plásmidos recombinantes de los *orfs* del operón *chr*.
- 6) *P. aeruginosa* ChrA. Cepa que posee el plásmido recombinante puc_chrA, el cual tiene al *orf91* clonado en el vector pUCP20. Resistente a ampicilina.
- 7) *P. aeruginosa* ChrB. Cepa que posee el plásmido recombinante puc_chrB, el cual tiene al *orf92* clonado en el vector pUCP20. Resistente a ampicilina.
- 8) *P. aeruginosa* ChrC. Cepa que posee el plásmido recombinante puc_chrC, el cual tiene al *orf90* clonado en el vector pUCP20. Resistente a ampicilina.
- 9) *P. aeruginosa* ChrAC. Cepa que posee el plásmido recombinante puc_chrAC, el cual tiene a los *orfs* 90 y 91 clonados en el vector pUCP20. Resistente a ampicilina.

7.3 Plásmidos y vectores empleados

- 1) pUM505 (Cervantes y col., 1986): Es un plásmido conjugativo, confiere resistencia a Cr^R, Hg^R y Cp^R.
- 2) Plásmido recombinante puc_chrB, el posee al *orf92* clonado en el vector pUCP20. Confiere resistencia a ampicilina.
- 3) Plásmido recombinante puc_chrC, el posee al *orf90* clonado en el vector pUCP20. Confiere resistencia a ampicilina.
- 4) Plásmido recombinante puc_chrAC, el posee a los *orfs* 90 y 91 clonados en el vector pUCP20. Confiere resistencia a ampicilina.

7.4 Oligonucleótidos empleados

Se utilizaron parejas de oligonucleótidos específicos diseñados con base en la secuencia del plásmido pUM505 para la amplificación de manera individual y en conjunto de los *orfs* 90, 91 y 92 del operón *chr*. Las secuencias de los oligonucleótidos y sus características se enlistan en la **Tabla 1**, también se muestran las condiciones empleadas en la **Tabla 2**.

7.5 Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina

Para el aislamiento de los plásmidos se utilizó el método de lisis alcalina (adaptado de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1981), de acuerdo al siguiente protocolo: Se crecieron cultivos bacterianos en 4 mL de CN, durante 18 h a 37°C, con agitación constante. Posteriormente se centrifugó durante 2 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante, hasta eliminar el medio de cultivo. El sedimento se resuspendió en 100 µL de la solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM), y se le adicionó 20 µL de una solución de lisozima (20 mg/mL), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. A la suspensión se le agregó 300 µL de la solución lítica recién preparada (NaOH 0.2 N y SDS 1%), se mezcló suavemente y se mantuvo durante 10 min en hielo. Transcurrido ese tiempo se le adicionó 300 µL de una solución de acetato de potasio 3 M, pH 4.8, se mezcló ligeramente y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se adicionaron 500 µL de la mezcla fenol:cloroformo (1:1), se mezcló moderadamente y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa superior, se le adicionó 1 mL de etanol absoluto frío y se incubó durante 20 min a -80°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. El sedimento se lavó dos veces con 500 µL de etanol al 70% centrifugando durante 5 min a 12000 rpm entre cada lavado, se recuperó el sedimento y se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla de DNA obtenida en 50 µL de agua desionizada y estéril. Se adicionó 5 µL de RNasa (Promega) y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se inactivó la RNasa incubando 15 min a 65°C. Las muestras se almacenaron a -20°C y se sometieron a corrimientos electroforéticos en geles de agarosa.

7.6 Aislamiento de DNA plasmídico por el método de Casse

Se incubó un cultivo bacteriano en medio LB (matraz con 30 mL) durante toda la noche a 30 o 37°C con agitación constante, se centrifugó a 8000 rpm a 4°C durante

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR de los genes del operón *chr* (*orf* 90-92).

<i>Orf</i>	Oligonucleótido	Secuencia 5' → 3'	Tamaño (pb) del amplificado
90-92 (<i>chrA-C</i>)	OD	AGCGCTT <u>G</u> CAT <u>G</u> CGAGCATTTACAT	3300 pb
	OR	CAAGGGCGTCGCA <u>AAGCTT</u> CAAACAC	
90 (<i>chrC</i>)	OD	AGCGCTT <u>G</u> CAT <u>G</u> CGAGCATTTACAT	800 pb
	OR	CAAGGGCGTCGCA <u>AAGCTT</u> CAAACAC	
91 (<i>chrA</i>)	OD	AGCGCTT <u>G</u> CAT <u>G</u> CGAGCATTTACAT	1600 pb
	OR	CAAGGGCGTCGCA <u>AAGCTT</u> CAAACAC	
92 (<i>chrB</i>)	OD	AGCGCTT <u>G</u> CAT <u>G</u> CGAGCATTTACAT	1300 pb
	OR	CAAGGGCGTCGCA <u>AAGCTT</u> CAAACAC	

Tabla 2. Condiciones empleadas para la amplificación de los *orfs* 90, 91 y 92 por PCR.

		Temperatura	Tiempo
Condiciones de amplificación (30 ciclos)	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
	Desnaturalización	95°C	30 seg
	Alineamiento	55°C	30 seg
	Extensión	72°C	1 min
	Extensión final	72°C	5 min

10 min. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió totalmente la pastilla obtenida a 500 µL de Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) y se utilizó vortex. Se adicionó 9.6 mL de la solución lítica preparada con: 5.0 mL de Tris-HCl 1 M (pH 8.0), 4.0 mL de EDTA 0.5 M, 5.0 mL de SDS al 20%, 5.5 mL de NaOH 2 N y 80.50 mL de agua destilada. Se mantuvo a los tubos en agitación suave durante 25 min a 34°C. Se agregó 990 µL de Tris-HCl 2 M (pH 7.0), se incubó en agitación suave durante 10 min. Se añadió 2 ml de NaCl 5 M y se mantuvo en agitación suave durante 10 min. Se conservó en hielo durante 1 h o más. Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 25 min. Se recuperó el sobrenadante por decantación en otro tubo y se agregó 1 volumen de fenol saturado con amortiguador TE, se mezcló. Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 15 min. Se extrajo la fase acuosa (con pipeta Pasteur) para pasarla a otro tubo, se añadió 1 volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se mezcló y se conservó a -20°C toda la noche. Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Finalmente, se eliminó el etanol por decantación, se secó al vacío la pastilla obtenida y se resuspendió en 100 µL de amortiguador TE. Se guardó a -20°C.

7.7 Amplificación por PCR

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con base a la secuencia de los *orfs* 90, 91 y 92 (**Tabla 1**). Para la amplificación por PCR se hizo una mezcla que contenía: DNA (~100 ng), oligonucleótidos directo y reverso a una concentración de 10 picomoles, 5 µL de la mezcla de reacción Master Mix (Promega) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl₂, dNTPs y un amortiguador de reacción a concentraciones optimizadas. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 10 µL. El proceso se realizó empleando un termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cyce, utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 2**.

7.8 Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos que se amplificaron por PCR se sometieron a un corrimiento electroforético, para lo cual se preparó un gel de agarosa (Sigma) al 1 % (p/v) en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM). El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, con el mismo amortiguador. La muestra de la amplificación se mezcló con 2 µL de amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.05 %, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.5 %, sacarosa 40 %) y se descargó en los orificios del gel. La cámara de electroforesis se conectó a una fuente de poder (E-C Apparatus Corporation modelo EC452) y se sometió a una corriente constante de 120 voltios durante 30-40 min. Posteriormente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.01 % durante 10 min. Para observar las bandas obtenidas se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta de onda corta (UV-Products Inc.). Como marcador de tamaño se utilizó el marcador de 1 Kb plus (Invitrogen).

7.9 Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes de *E. coli* JM101 y *P. aeruginosa* PAO1 *lasI/rhlI* se siguió el método adaptado de Enderle y Farwell, (1988), el cual se describe a continuación:

Se crecieron los cultivos en placas de agar durante 18 h a 37°C y posteriormente se transfirió una asada de células con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en 500 µL de agua desionizada estéril y fría. Las células se resuspendieron en vórtex hasta que se formó una mezcla homogénea. Se centrifugó a 13000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces con 500 µL de agua desionizada estéril y fría. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 500 µL de agua fría desionizada estéril.

7.10 Transformación por el método de electroporación

A 100 µL de células competentes se les adicionó 1 µL de DNA a una concentración aproximada de 40 ng/µL; la mezcla se colocó en una celda para electroporación 215 (Eppendorf) y se sometió a un pulso eléctrico de 1.8 kilovoltios. Se transfirió inmediatamente a un tubo con 2 mL de CL incubándose por 1 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se distribuyeron 100 µL del cultivo en placas de AL

selectivo (100 µg/mL de ampicilina para *E. coli* y 400 µg/mL de carbenicilina para *P. aeruginosa*) incubándose a 37°C durante toda la noche.

7.11 Pruebas de susceptibilidad en medio líquido.

De un cultivo de 4 mL de CN crecido durante la noche se tomaron 40 µL para inocular tubos con 4 mL de CN con concentraciones crecientes de cromato (K_2CrO_4). Los tubos se incubaron 18 h a 37°C con agitación constante y la susceptibilidad se determinó en función de la turbidez de los cultivos al medir la absorbencia a 600 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21, Miltron Roy.

7.12 Virulencia en el modelo de nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés, en medio M9 a 37°C durante 18 h. Adicionalmente, se crecieron durante 5-6 días nematodos *C. elegans*, hasta alcanzar la edad adulta, en una placa con medio NGM (medio de crecimiento de nemátodos) a 18°C. En una placa de 96 pozos, se colocó 1.5 µL (1×10^4 UFC) de las cepas de interés y se llevo a un volumen final de 200 µL con medio M9, se adicionaron 18-20 nematodos por pocillo en esterilidad, se cuantifico el numero de nematodos vivos dando un ligero toque con un asa estéril y se incubo a 18°C durante 3 días, se monitoreo la sobrevivencia de los nematodos cada 4 h, tomando como nematodos muertos aquellos que al tocarlos no tienen movimiento. Al final se grafico el porcentaje de sobrevivencia contra el tiempo en que fueron observados los nemátodos.

7.13 Ensayos de toxicidad en el modelo del nematodo *C. elegans*

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés, en medio M9 a 37°C toda la noche. Los cultivos fueron centrifugados por 10 min a 12000 rpm y se recuperó el sobrenadante. En una placa de 96 pozos, se colocó 1.5 µL de los sobrenadantes y se llevo a un volumen final de 200 µL con medio M9. A las muestras de sobrenadante se adiciono 18-20 nematodos por pocillo, se incubó a 18°C durante 3 días y se cuantificarón los nematodos vivos monitoreando la sobrevivencia de los

nematodos cada 4 horas, tomando como nematodos muertos aquellos que al tocarlos no tienen movimiento. Al final se graficó el porcentaje de sobrevivencia contra el tiempo en que fueron observados los nemátodos.

VIII. Resultados

8.1 Amplificación mediante PCR de los genes *chrA*, *chrB*, *chrAC* y *chrC* de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1

Para comprobar la presencia de los genes *chrA*, *chrB*, *chrAC* y *chrC* en las cepas de estudio, se aisló el DNA plasmídico de las diferentes cepas por medio de una lisis alcalina y se llevó a cabo la amplificación por PCR. Para lo cual se utilizó los oligos directo y reverso para cada gen y las condiciones que se encuentran descritas en las **tablas 1 y 2**. Los productos amplificados se sometieron a corrimiento electroforético. En la **Figura 8** se muestran los productos de amplificación con los tamaños esperados, la amplificación del gen *chrA* presentó una banda de amplificación de 1.250 kb, para *chrB* una banda de 1.161 kb, para el gen *chrC* de 500 pb y para *chrAC* (*chrA* y *chrC*) de 2 kb, estos resultados confirmaron la presencia de los plásmidos recombinantes con los genes *chr* en la cepas de estudio.

8.2 Pruebas de susceptibilidad a cromato de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chrA*, *chrB*, *chrC* y *chrAC* (*chrA* y *chrC*)

Una vez que se confirmó la presencia de los genes *chr*, se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad a dicromato de potasio, esto con el propósito de confirmar que el fenotipo de resistencia conferido por *chrA* seguía estando presente. Se realizó una curva de susceptibilidad a concentraciones crecientes (0.0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 mM) de dicromato de potasio. Se utilizó como control negativo a la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 y como control positivo a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 con el plásmido pUM505. En la **Figura 9** se observa que la presencia de *chrA* en *P. aeruginosa* muestra un comportamiento similar a la cepa de *P. aeruginosa* pUM505, siendo que ambas cepas presentan una mayor densidad a altas concentraciones de cromato. Se observa que la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1; así como también a las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chrB* y *chrC*,

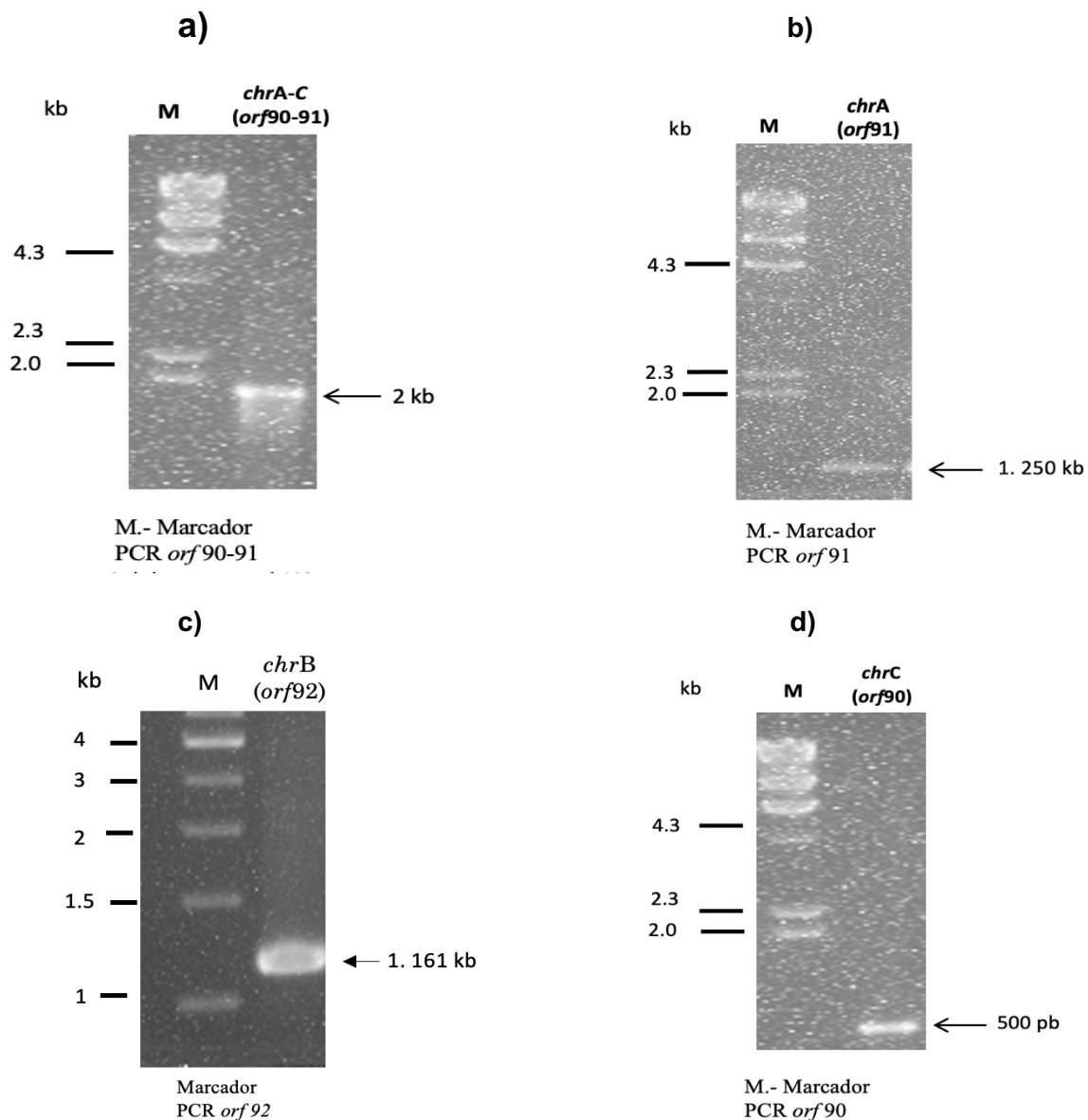


Figura 8. Amplificación mediante PCR de los genes *chrA*, *chrB*, *chrAC* y *chrC* de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. a) Se muestra el producto de amplificación correspondiente a los genes *chrA-C* con una banda de 2.0 kb, b) para *chrA* con una banda de 1.250 kb, c) para el gen *chrB* con una banda de 1.161 kb, y d) para *chrC* con una banda de 500 pb. Se muestran las fotografías de la electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio al 5%.

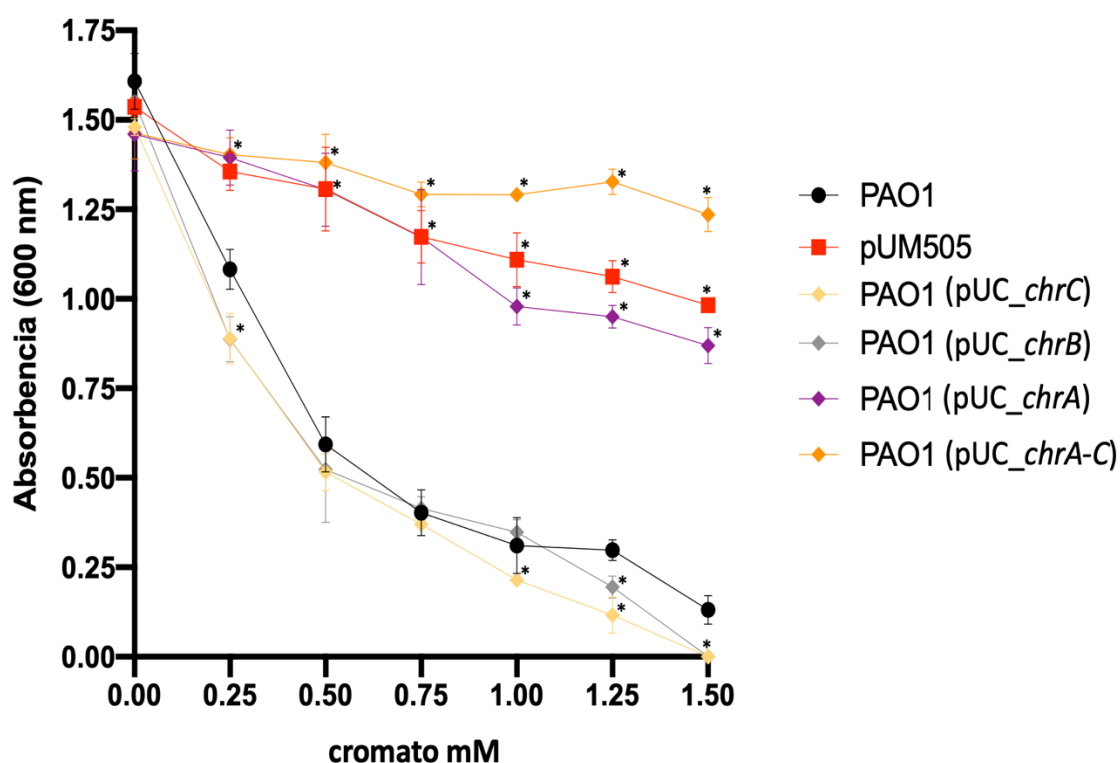


Figura 9. Curva de susceptibilidad a cromato de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chrA*, *chrB*, *chrC* y *chrAC* (*chrA* y *chrC*). Los cultivos de las diferentes cepas se crecieron en CN por 18 h, a 37°C con una agitación constante, se muestran las diferentes concentraciones a las que fueron crecidas, los cuales fueron medidos a una absorbancia de 600 nm. Las barras corresponden al error estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Dunnet, * $p < 0.05$.

disminuyen su crecimiento al aumentar la concentración de cromato, sugiriendo un fenotipo susceptible al cromato. Por otro lado, se observa que la cepa que contiene a los genes *chrA* y *chrC* en conjunto tiene un crecimiento similar a las cepas de *P. aeruginosa* (pUC_chrA) y *P. aeruginosa* (pUM505). Estos resultados confirman que las cepas de estudio que poseen al gen *chrA* son resistentes a cromato.

8.3 Virulencia conferida por el gen *chrA* sobre la cepa de *P. aeruginosa* PAO1

Con el propósito de evaluar la participación de los genes *chr* en la virulencia, se realizaron ensayos de virulencia empleando el modelo de *C. elegans*. Se utilizó como control negativo de la virulencia a la cepa silvestres de *P. aeruginosa* PAO1 y como control positivo a la cepa *P. aeruginosa* con el plásmido pUM505. En la **Figura 10** se muestra que las cepas de *P. aeruginosa* (pUC_chrB) y *P. aeruginosa* (pUC_chrC) presentan un comportamiento similar al control negativo, en donde se observa que la sobrevivencia de los nematodos fue de alrededor de 80%, mientras que la sobrevivencia de los nematodos incubados con *P. aeruginosa* PAO1 fue de 75%, sugiriendo que estas cepas no son virulentas. Por otro lado, la cepa de *P. aeruginosa* (pUC_chrA) y *P. aeruginosa* (pUC_chrAC) mostraron un comportamiento similar al del control positivo (el cual generó una sobrevivencia de 30% de los nematodos), disminuyendo considerablemente la sobrevivencia de los nematodos a valores de entre 20 y 30%. Estos resultados indican que el gen *chrA* incrementa la virulencia de *P. aeruginosa*.

8.4 Toxicidad del sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* en presencia del gen *chrA*

El gen *chrA* codifica para la proteína ChrA, una proteína de membrana que lleva a cabo la expulsión de cromato, sin embargo, esta proteína no había sido relacionada con el aumento de virulencia de *P. aeruginosa*. Por lo que se determinó el efecto del sobrenadante libre de células en el aumento de la toxicidad de *P. aeruginosa*.

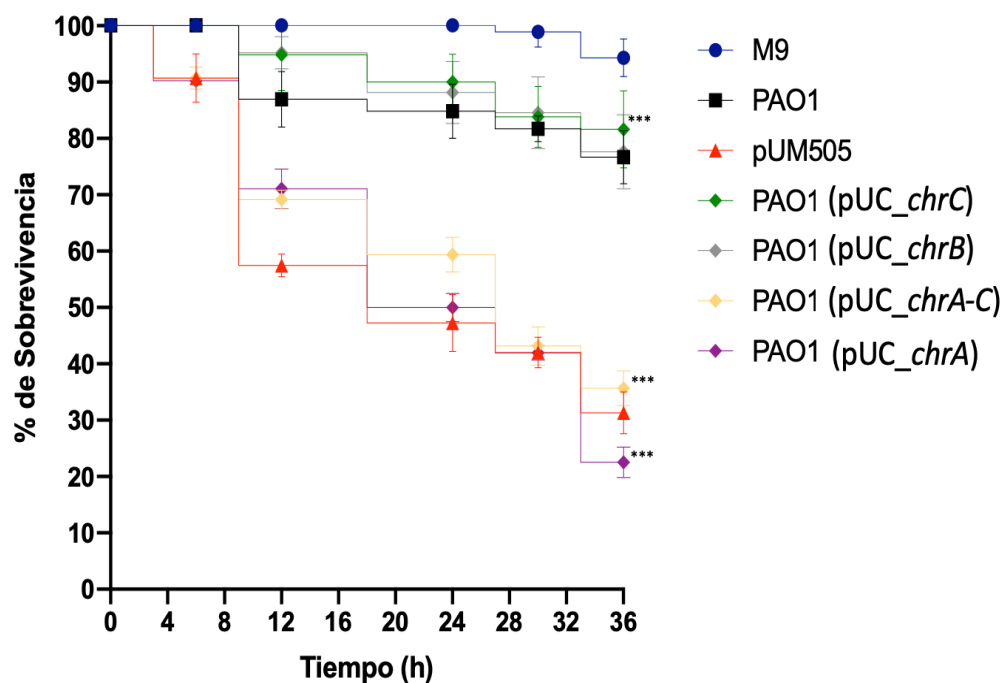


Figura 10. Virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*. Las cepas de interés fueron crecidas en medio M9 a 37°C durante 18 h con agitación constante. Los diferentes grupos de nematodos fueron incubados con 1×10^4 UFC de las cepas y se incubaron a 20°C, se monitoreó el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** $< p0.01$.

Para este ensayo se empleó el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 como control negativo y el sobrenadante de *P. aeruginosa* (pUM505) como control positivo. Los resultados mostraron que los nematodos inoculados con el sobrenadante de *P. aeruginosa* (pUC_chxB) y *P. aeruginosa* (pUC_chxC) tuvieron un porcentaje de sobrevivencia de aproximadamente 75%, que fue similar al del control negativo *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 11**); con esto se mostró que los sobrenadantes de estas cepas no son tóxicos. En cambio, los nematodos que fueron inoculados con los sobrenadantes de *P. aeruginosa* (pUC_chxA) y *P. aeruginosa* (pUC_chxAC), tuvieron un comportamiento similar a los nematodos inoculados con el sobrenadante de *P. aeruginosa* (pUM505); en los que el porcentaje de sobrevivencia de los nematodos disminuyó a aproximadamente 30%. Estos resultados sugieren que la proteína ChrA podría estar secretando alguna molécula que esté relacionada con el aumento de la virulencia de *P. aeruginosa*.

8.5 Evaluación de la expresión del gen *chrA* en la susceptibilidad de dicromato de potasio en medio mínimo (M9)

Se ha reportado que las bacterias presentan la capacidad de adaptarse a su entorno, dependiendo del medio de crecimiento podría modificar la expresión de múltiples genes, pudiendo modificar el fenotipo de virulencia o resistencia. Por lo cual se llevó a cabo la determinación de la susceptibilidad de las cepas de estudio al cromato, empleando al medio mínimo M9, medio que ha sido empleado para el crecimiento de las bacterias en ensayos de virulencia y toxicidad. Se llevaron a cabo curvas de susceptibilidad utilizando concentraciones crecientes de cromato a 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 μM . Los resultados mostraron que si bien en general en este medio todas las cepas son más susceptibles al cromato en comparación con el medio nutritivo previamente empleado (**Figura 9**), las cepas de *P. aeruginosa* (pUC_chxA) y *P. aeruginosa* (pUM505) mostraron ser resistentes al cromato en comparación con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 12**). Estos resultados mostraron que el crecimiento de las cepas en M9 no modifica la resistencia a cromato conferida por la proteína ChrA.

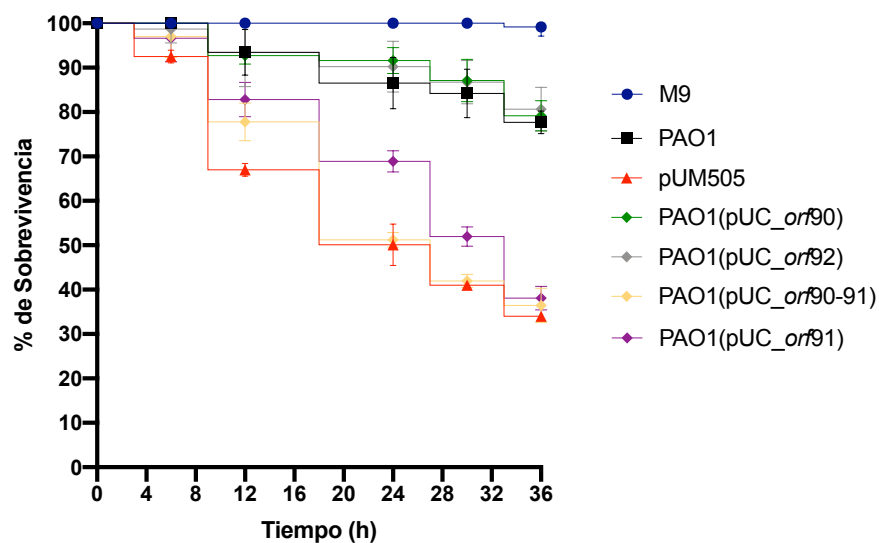


Figura 11. Evaluación de la toxicidad de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*. Los diferentes grupos de nematodos fueron inoculados con los sobrenadantes de las cepas de interés, las cuales fueron crecidas en medio M9 a 37 °C durante 18 h con agitación constante, posterior a esto se centrifugó, par así obtener el sobrenadante. Los nematodos inoculados se incubaron a 20 °C, se evaluó la toxicidad monitoreando el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** <p0.01.

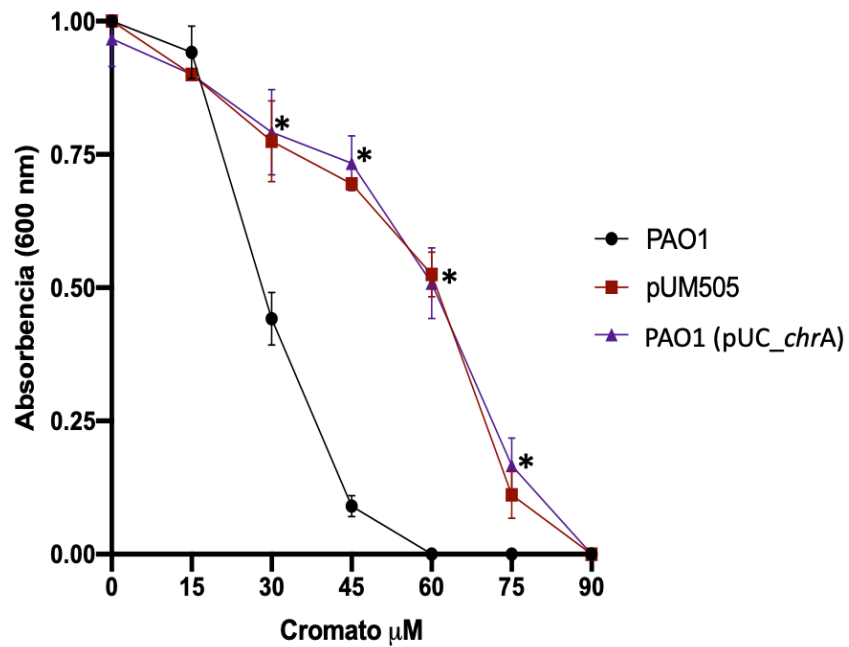


Figura 12. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *P. aeruginosa* con *chrA* en medio mínimo (M9). Los cultivos de las diferentes cepas se crecieron en medio M9 por 18 h, a 37°C con una agitación constante. Las diferentes concentraciones a las que fueron crecidas se muestran en la gráfica; se realizó la medición a una absorbancia de 600 nm. Las barras corresponden al error estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Dunnet, * $p < 0.05$.

8.6 Determinación de la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* con el gen *chrA* adicionando cianuro de potasio

La proteína ChrA es un transportador de membrana, ampliamente estudiado. ChrA expulsa cromato empleando el diferencial del potencial de membrana. Por lo que se evaluó la participación de la proteína ChrA en la virulencia empleando cultivos suplementados con compuestos que abaten el potencial de membrana. El primer compuesto que se analizó fue el cianuro de potasio (KCN), un inhibidor del potencial de membrana. Primeramente, se realizaron cinéticas de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de KCN de las cepas de estudio, para determinar la concentración subinhibitoria del KCN que no afectara su crecimiento. Se estableció la concentración de 100 μ M de KCN como concentración subinhibitoria. Los resultados mostraron que los nematodos que fueron incubados con *P. aeruginosa* (pUC_ *chrA*) y *P. aeruginosa* pUM505 tuvieron una sobrevivencia similar a de los nematodos incubados con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 13**), teniendo entre un 80 a 90 % de sobrevivencia. Estos datos indican que la virulencia conferida por la proteína ChrA depende del potencial de membrana, el cual es abatido por la adición de KCN, además, sugieren que la molécula responsable de la virulencia es secretada por ChrA.

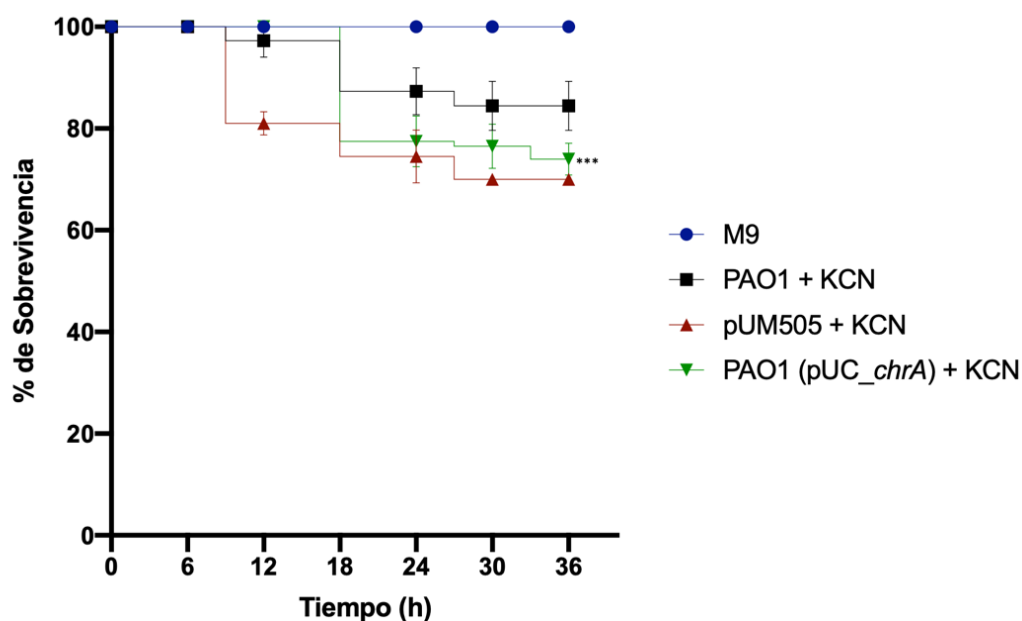


Figura 13. Virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* con el gen *chrA* adicionando cianuro de potasio. Los diferentes grupos de nematodos fueron incubados con las cepas de interés, las cuales fueron crecidas en medio M9 a 37°C durante 18 h con agitación constante, adicionando 100 μ M de KCN. Los nematodos inoculados se incubaron a 20°C, posterior a esto se monitoreó el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** <p0.01.

8.7 Evaluación de la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* con el gen *chrA* adicionando N- acetilcisteína

Estudios han demostrado que la N-acetilcisteína (NAC) actúa como un compuesto antioxidante precursor del glutathion (GSH), el cual es el principal sistema antioxidante intra y extra celular. Con el propósito de evaluar la participación del estrés oxidativo en la virulencia conferida por la proteína ChrA se realizaron ensayos de virulencia de las cepas crecidas con este compuesto. Primeramente, se realizaron cinéticas de crecimiento empleando concentraciones crecientes de NAC para determinar la concentración subinhibitoria a emplear. Se empleó una concentración subinhibitoria de 7.5 mM de NAC para realizar los ensayos de virulencia, empleando *C. elegans* como modelo de virulencia. Los resultados mostraron como se observa en la **Figura 14**, que los nematodos que fueron incubados con cultivos de *P. aeruginosa* (pUC_ *chrA*) y *P. aeruginosa* pUM505 crecidos en presencia de NAC tuvieron una sobrevivencia similar a de los nematodos incubados con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, mostrando entre 75 a 90% de sobrevivencia, indicando que la incubación con NAC disminuye la virulencia de *P. aeruginosa* conferida por el gen *chrA*. Estos datos sugieren que la expresión de la proteína ChrA además de incrementar la virulencia de la bacteria, puede generar el incremento del estrés oxidativo celular, sugiriendo una probable conexión entre ambos fenómenos.

8.8 Determinación de la virulencia de los genes *chr* en la cepa de *E. coli* JM101

Con el propósito de evaluar la participación del gen *chr* en la virulencia de *E. coli*, los plásmidos pUC_ *chrA*, pUC_ *chrB* y pUC_ *chrC* fueron transferidos a la cepa de *E. coli* JM101, cepa en la que se ha descrito que el gen *chrA* no es funcional con respecto a la resistencia a cromato. Después se realizaron ensayos de resistencia a dicromato de potasio para evaluar su participación en la resistencia a cromato. Los resultados mostraron, como se esperaba, que las cepas que expresan el gen ChrA no mostraron resistencia a cromato, las cepas fueron igual de sensibles que

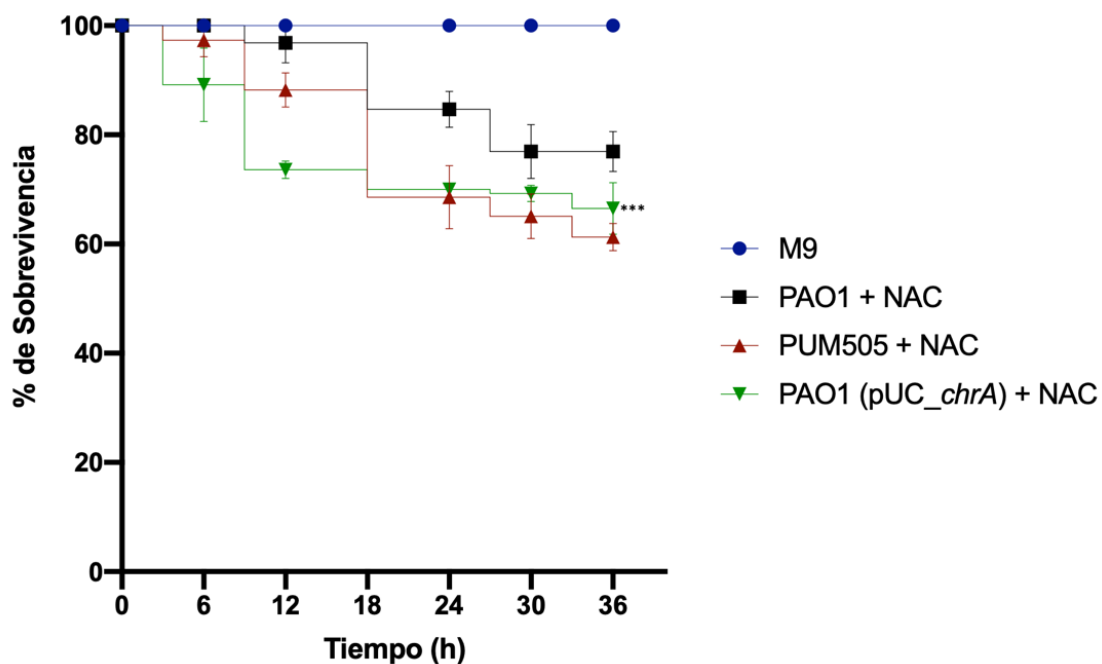


Figura 14. Virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* que expresan al gen *chrA* crecidas en presencia de NAC. Los diferentes grupos de nematodos fueron inoculados por las cepas de interés, las cuales fueron crecidas en medio M9 suplementado con 7.5 mM de NAC a 37°C durante 18 h con agitación constante. Los nematodos con las bacterias se incubaron a 20°C, posterior a esto se monitoreó el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** <p0.01.

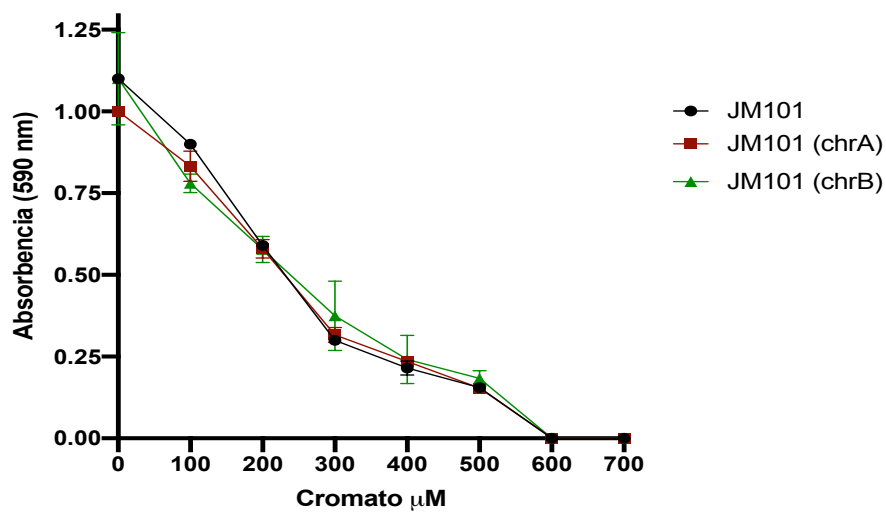


Figura 15. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *E. coli* JM101 con genes *chr*. Cultivos de las cepas de *E. coli* JM101 con los genes *chrA* y *chrB* se crecieron en medio M9 por 18 h, a 37°C con una agitación constante. Las diferentes concentraciones a las que fueron crecidas se muestran en la gráfica; se realizó la medición a una absorbancia de 600 nm. Las barras corresponden al error estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Dunnet, ns, no significativo.

E. coli JM101 (**Figura 15**). Posteriormente, se realizaron ensayos de virulencia empleando el modelo de *C. elegans*. Los resultados mostraron que los nematodos inoculados con las cepas de *E. coli* JM101 con los genes *chr* no presentaron un cambio significativo en el porcentaje de sobrevivencia con respecto al control negativo *E. coli* JM101 (**Figura 16**), lo que indica que el gen *chrA* no es capaz de conferir virulencia en este fondo genético.

8.9 Susceptibilidad a cromato de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhlI* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*

Se ha reportado que múltiples genes de virulencia de *P. aeruginosa* son regulados bajo el sistema de QS, por lo que se determinó la participación del sistema de QS en la virulencia conferida por los genes *chr*. Primeramente, se realizó la transformación de los plásmidos pUC_*chrA*, pUC_*chrB* y pUC_*chrC* a la cepa doble mutante de *P. aeruginosa lasI/rhlI*, mutante en el sistema de QS. Se llevaron a cabo ensayos de susceptibilidad dicromato de potasio. Se utilizó como control negativo a la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 y como control positivo a *P. aeruginosa* con el plásmido pUM505. Los resultados mostraron (**Figura 17**) que la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhlI* (pUC_*chrA*) mostró un nivel de crecimiento similar a la que mostró la cepa de *P. aeruginosa* (pUM505), a diferencia de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhlI*, la cual mostró poco crecimiento, un resultado similar al observado en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Estos resultados indican que el gen *chrA* no es regulado por el sistema de *quorum sensing*.

8.10 Virulencia de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhlI* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*

Estudios previos sugieren que el gen *chrA* podría estar implicado en el aumento de la virulencia de *P. aeruginosa*. Dado a que en *P. aeruginosa* múltiples genes que codifican a factores de virulencia son regulados mediante QS, se evaluó la participación del sistema de QS en la regulación de la función de los *chr*.

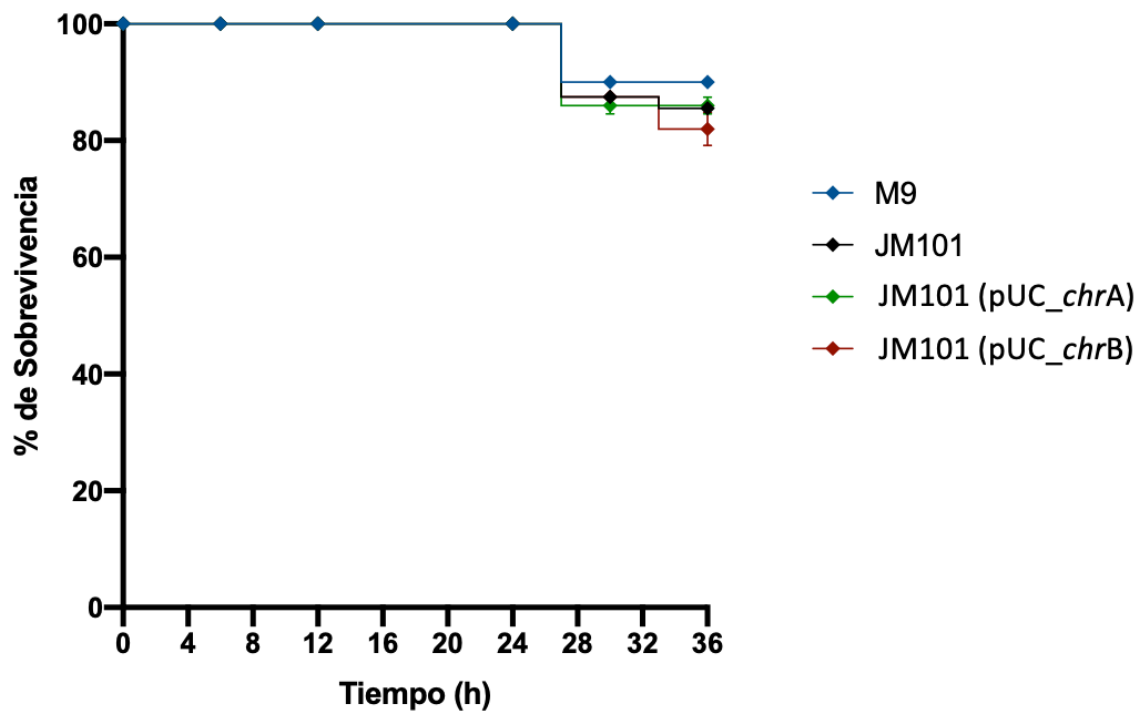


Figura 16. Evaluación de la participación de los genes *chrA* y *chrB* en la virulencia de *E. coli* JM101. Los diferentes grupos de nematodos fueron inoculados por las cepas de interés, las cuales fueron crecidas en medio M9 a 37°C durante 18 h con agitación constante. Los nematodos inoculados se incubaron a 20°C, se monitoreó el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** <p0.01.

Se llevaron a cabo ensayos de virulencia utilizando el modelo de *C. elegans*, como control negativo se uso a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y como control positivo a la cepa de *P. aeruginosa* (pUM505). Los resultados mostraron que los nematodos inoculados con las cepas de *P. aeruginosa lasl/rhlI* con el *chrA* así como *P. aeruginosa* (pUM505) disminuyeron en un 20 a 40 % de sobrevivencia; en comparación a los nematodos inoculados con las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa lasl/rhlI*, las cuales mostraron que al termino del experimento no presentaron una disminución significativa en la sobrevivencia con respecto a la incubación con el medio M9 (**Figura 18**). También se observo un comportamiento similar al control negativo con los nematodos inoculados con las cepas de *P. aeruginosa lasl/rhlI* que poseen a los genes *chrB* y *chrC*. Esto sugiere que el sistema de QS no regula la función de los genes *chr* en el fenotipo de virulencia.

8.11 Toxicidad del sobrenadante de las cepas *P. aeruginosa lasl/rhlI* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*

La proteína ChrA es una proteína de membrana que lleva a cabo la expulsión de cromato. Para determinar si la virulencia conferida por el sobrenadante de la bacteria que posee al gen *chrA* es regulado por el QS, se analizaron los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa lasl/rhlI* con los genes *chr*. Los resultados mostraron que nematodos inoculados con los sobrenadantes de la cepas de *P. aeruginosa* (pUM505) y de *P. aeruginosa lasl/rhlI* (pUC_ *chrA*) presentaron un nivel de sobrevivencia similar, mientras que los nematodos inoculados con los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa lasl/rhlI* con los genes *chrB* y *chrC* (**Figura 19**) fue similar a lo observado con los nematodos inoculados con los sobrenadantes de la cepa de *P. aeruginosa lasl/rhlI*. Lo cual refuerza la observación de que el QS no modula la virulencia conferida por los genes *chr*.

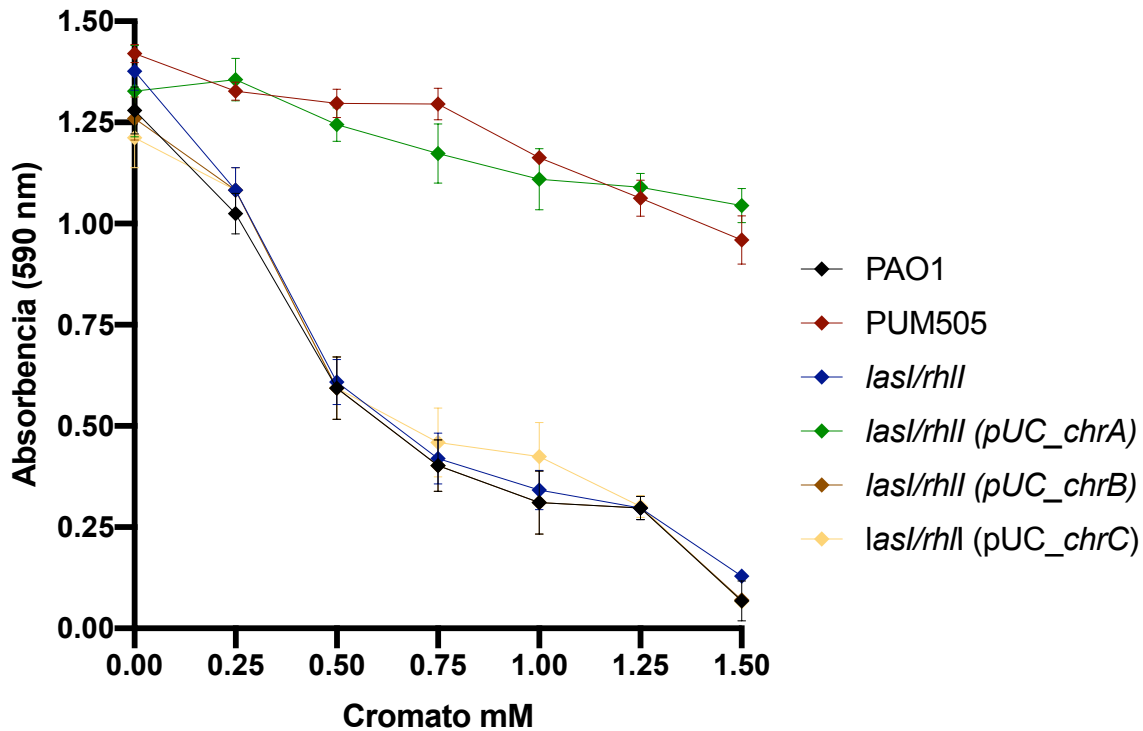


Figura 17. Curvas de susceptibilidad a cromato de la cepa de *P. aeruginosa* *lasI/rhl* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*. Los cultivos de las diferentes cepas se crecieron en CN por 18 h, a 37°C con una agitación constante, se muestran las diferentes concentraciones a las que fueron crecidas, los cuales fueron medidos a una absorbancia de 600 nm. Las barras corresponden al error estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Dunnet, * $p < 0.05$.

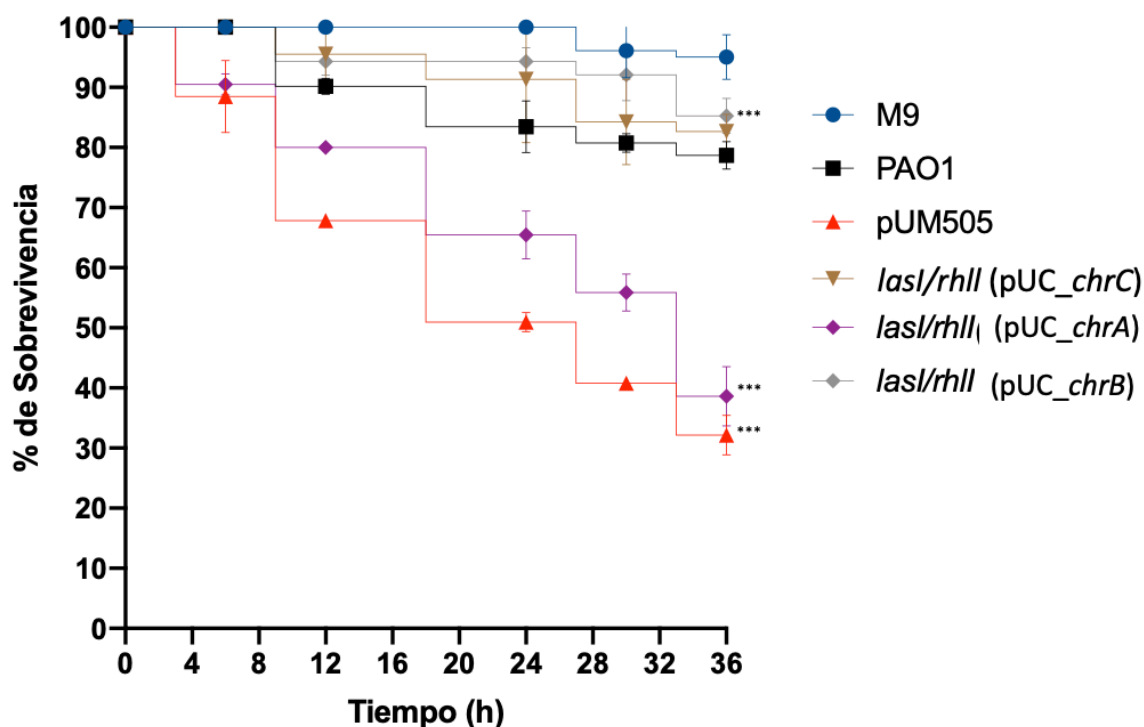


Figura 18. Ensayo de virulencia de la cepa de *P. aeruginosa lasI/rhlI* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*. Los diferentes grupos de nematodos fueron inoculados por las cepas de interés, las cuales fueron crecidas en medio M9 a 37°C durante 18 h con agitación constante. Los nematodos inoculados se incubaron a 20°C, se monitoreó el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** <p0.01.

8.12 Susceptibilidad a cromato de las mutantes de *P. aeruginosa lasI* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*

Estudios han demostrado que el QS de *P. aeruginosa* es un sistema de comunicación el cual se activa jerárquicamente, iniciando con el sistema *Las*. Por lo cual se llevo a cabo la transformación de los genes *chrA*, *chrB* y *chrC* a la cepa mutante sencilla *lasI*, para determinar si estos genes son regulados por el sistema más alto jerárquicamente del QS. Posterior a esto, se llevaron a cabo pruebas de susceptibilidad a dicromato de potasio, se utilizó como control negativo a la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 y como control positivo a *P. aeruginosa* (pUM505). En la **figura 20** se muestra que las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa lasI*, *P. aeruginosa lasI* (pUC_ *chrB*) y *P. aeruginosa lasI* (pUC_ *chrC*) presentaron una disminución de la densidad celular a altas concentraciones de cromato. A diferencia de las cepas de *P. aeruginosa* (pUM505) y *P. aeruginosa lasI* (pUC_ *chrA*) en donde se observa que a altas concentraciones de dicromato de potasio su densidad celular prevalece, esto sugiere que el gen *chrA*, responsable de la expulsión de cromato, no esta siendo regulado por el sistema *Las* del QS.

8.13 Virulencia de los genes *chrA*, *chrB* y *chrC* en la cepa de *P. aeruginosa lasI*

Para evaluar si el fenotipo de virulencia conferida por los genes *chr* son regulados por el sistema *Las* del QS, se llevaron a cabo ensayos de sobrevivencia empleando el modelo de *C. elegans*, utilizando control negativo a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y como control positivo la cepa de *P. aeruginosa* con el plásmido PUM505. En la **figura 21** se muestra que los nematodos inoculados con las cepas de *P. aeruginosa lasI* con los genes *chrB* y *chrC* mostraron un nivel de sobrevivencia, similar a los nematodos incubados con *P. aeruginosa lasI*, mientras que los nematodos inoculados con las cepa de *P. aeruginosa* que posee al gen *chrA* disminuyeron considerablemente su porcentaje de sobrevivencia (20 a 30 %), similar a los observado en el grupo de nematodos inoculados con *P. aeruginosa* PUM505.

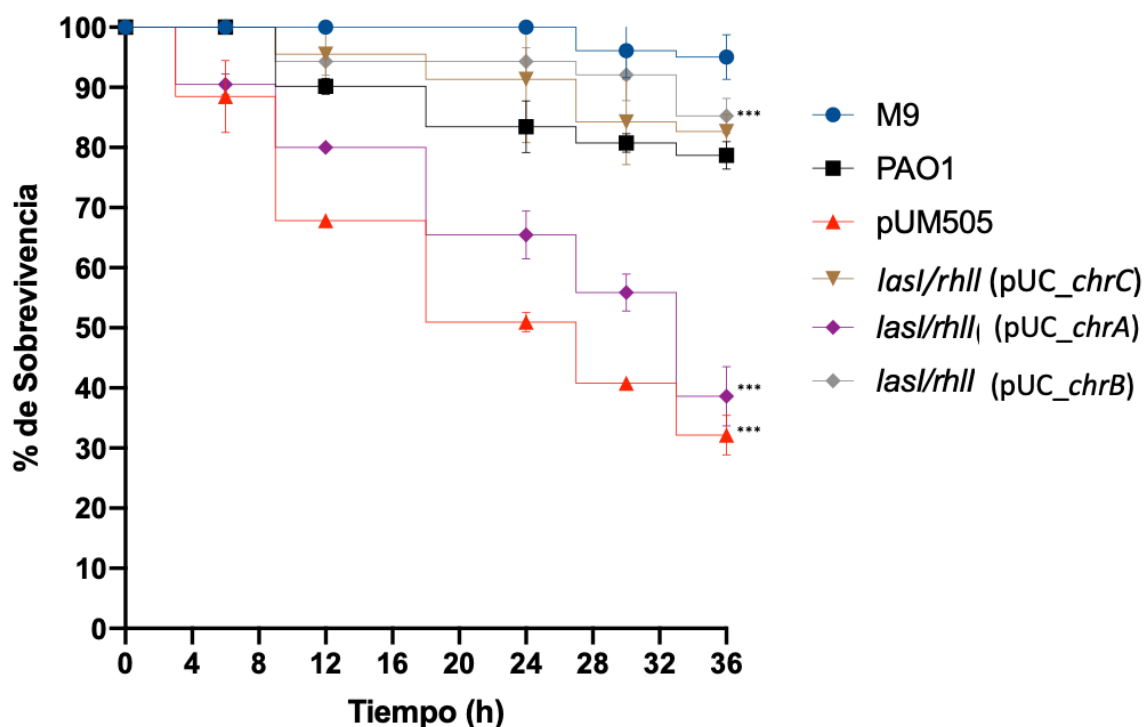


Figura 19. Toxicidad del sobrenadante de las cepas *P. aeruginosa lasI/rhlI* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*. Los diferentes grupos de nematodos fueron inoculados por las cepas de interés, las cuales fueron crecidas en medio M9 a 37°C durante 18 h con agitación constante. Se obtuvieron los sobrenadantes mediante centrifugación. Los nematodos inoculados se incubaron a 20°C, se monitoreó el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** <p0.01.

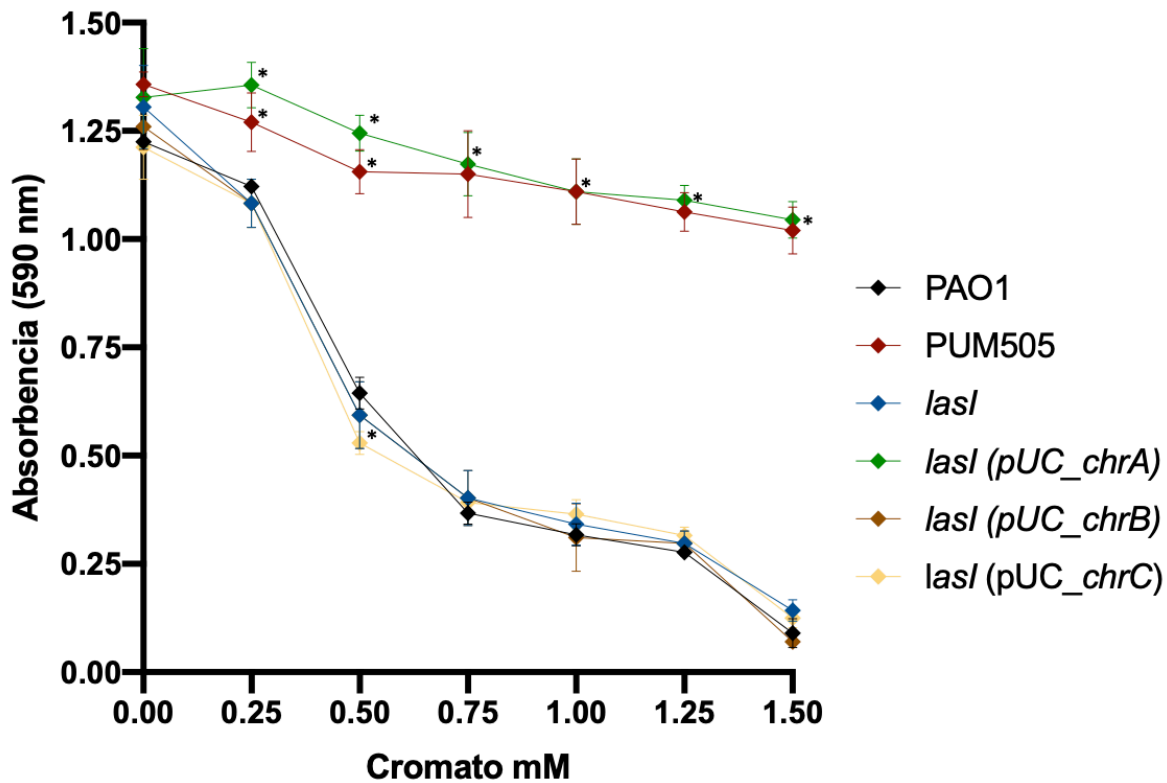


Figura 20. Evaluación de la susceptibilidad a cromato de los genes *chr* en la cepa mutante de *P. aeruginosa lasI*. Los cultivos de las diferentes cepas se crecieron en CN por 18 h, a 37°C con una agitación constante. Se muestran las diferentes concentraciones a las que fueron crecidas, los cuales fueron medidos a una absorbancia de 590 nm. Se muestra la sensibilidad de las diferentes cepas de *P. aeruginosa lasI*. Las barras corresponden al error estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba de Dunnet, * $p < 0.05$.

Esto sugiere que el sistema *Las*, siendo el sistema de mayor jerarquía en el sistema de QS de *P. aeruginosa*, no regula a los genes *chr* en el fenotipo de virulencia.

8.14 Toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* y *P. aeruginosa lasI/rhlI* con el gen *chrA* tratado con proteasas

Estudios previos han demostrado que el gen *chrA* codifica a una proteína de membrana que expulsa al cromato, sugiriendo la secreción de moléculas que participan en el aumento de la virulencia de *P. aeruginosa*. Por lo que se llevaron a cabo experimentos para evaluar la naturaleza de estas moléculas. Primeramente, el sobrenadante de los cultivos fue tratado con Pronasa R, una mezcla de proteasas que puede hidrolizar proteínas por la ruptura de enlaces peptídicos. Los resultados empleando los sobrenadantes tratados mostraron que los sobrenadantes de los cultivos de *P. aeruginosa* (pUM505), *P. aeruginosa* (pUC_ *chrA*) y *P. aeruginosa lasI/rhlI* (pUC_ *chrA*) redujeron su toxicidad, mostrando valores de sobrevivencia similares a los incubados con el sobrenadante de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 22**). Esto sugiere que las moléculas que son secretadas probablemente por *ChrA*, podrían ser de naturaleza proteica ya que son hidrolizadas por la Pronasa R, perdiendo así su capacidad de generar virulencia.

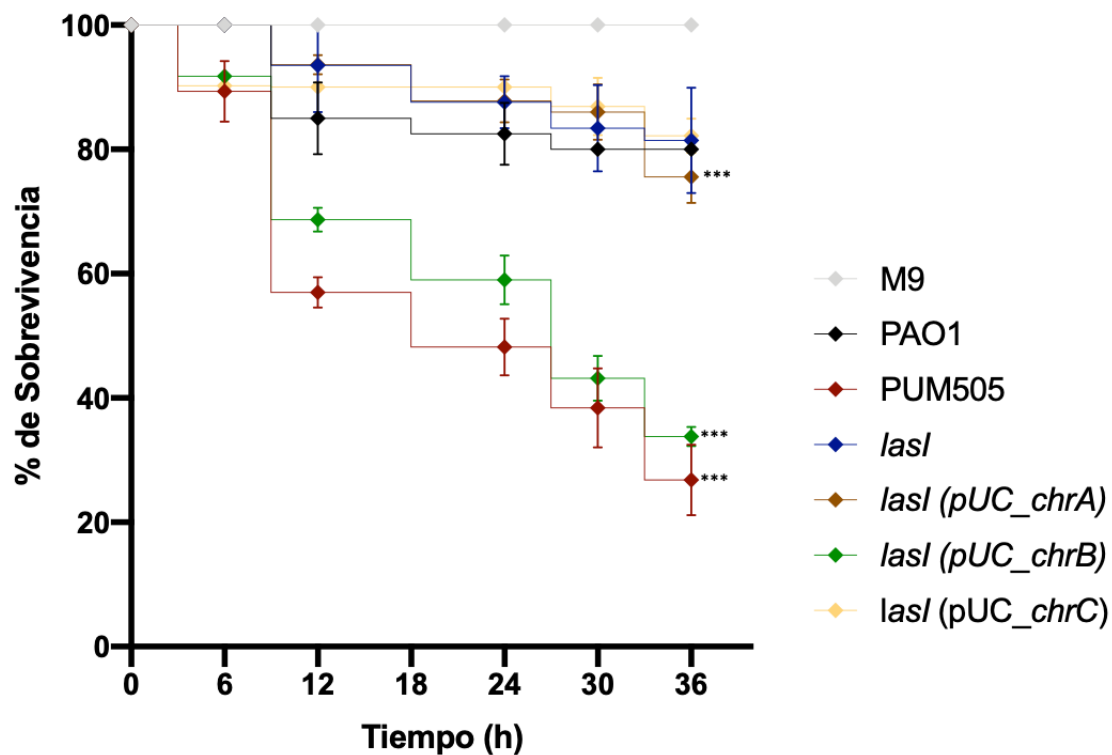


Figura 21. Ensayo de virulencia de la cepa de *P. aeruginosa lasI* con los genes *chrA*, *chrB* y *chrC*. Los diferentes grupos de nematodos fueron inoculados por las cepas de interés, las cuales fueron crecidas en medio M9 a 37°C durante 18 h con agitación constante. Los nematodos inoculados se incubaron a 20°C, se monitoreó el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** <p0.01.

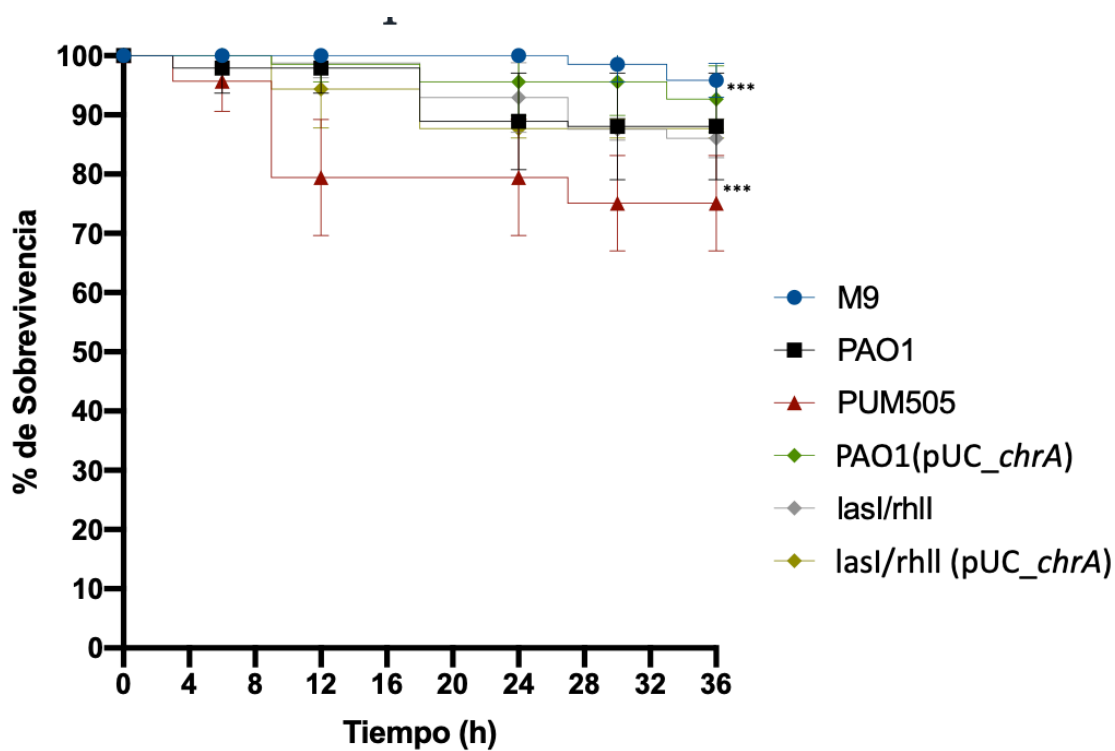


Figura 22. Evaluación de la toxicidad de los sobrenadantes tratados con proteasas de las cepas de *P. aeruginosa* y *P. aeruginosa lasI/rhlI* con el gen *chrA*. Se crecieron las diferentes cepas de interés y se obtuvieron los sobrenadantes de cada una, por medio de centrifugación, se trató cada uno con Pronasa R 10 mM. Los diferentes grupos de nematodos fueron inoculados con los sobrenadantes ya tratados con la Pronasa, se incubaron a 20°C, se monitoreó el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** <p0.01.

8.15 Toxicidad de los sobrenadantes de la cepas de *P. aeruginosa* y *P.aeruginosa lasl/rhlI* con el gen *chrA* tratado con calor

Se evaluó el efecto del tratamiento por calentamiento a 95°C durante 2 h de los sobrenadantes de los cultivos en la toxicidad en *C. elegans*. Los nematodos inoculados con los sobrenadantes tratados con calor de las cepas de *P. aeruginosa* (pUC_*chrA*) y *P. aeruginosa lasl/rhlI* (pUC_*chrA*) mostraron un comportamiento similar al de los nematodos inoculados por *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 23**). Reforzando la idea de que las moléculas secretadas probablemente a través de ChrA son de carácter proteico y son desnaturalizadas por la temperatura.

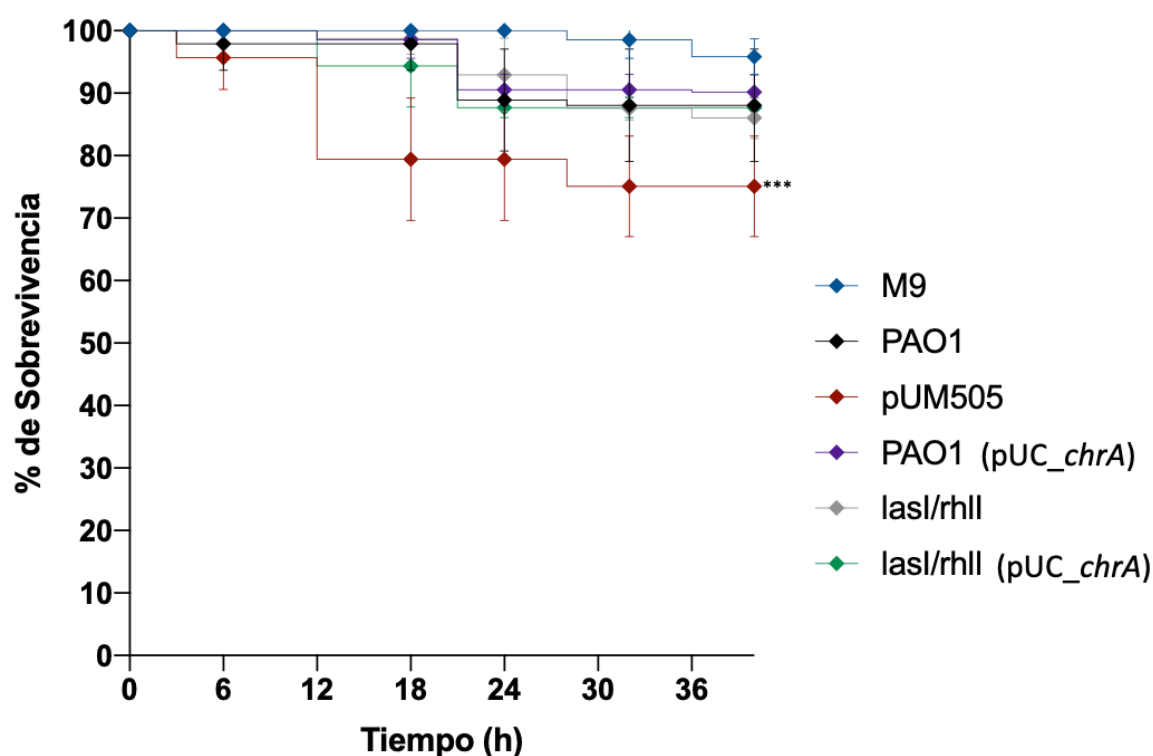


Figura 23. Toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* y *P.aeruginosa lasI/rhlI* con el gen *chrA* tratado con calor. Se crecieron las diferentes cepas de interés y se obtuvieron los sobrenadantes de cada una, por medio de centrifugación, se trató cada uno con calor por 2 h. Los diferentes grupos de nematodos fueron inoculados con los sobrenadantes ya tratados con calor, se incubaron a 20°C, se monitoreó el número de nematodos vivos en los tiempos indicados. Las barras corresponden al error estándar. Los datos se analizaron con la prueba Mantel-Cox *** <p0.01

IX. Discusión

La Organización Mundial de la Salud ha reclasificado a *P. aeruginosa* como un patógeno de alta prioridad, aunque no es un patógeno crítico, sigue siendo de prioridad y es necesario desarrollar nuevos antibióticos. Se estima que las infecciones causadas por bacterias resistentes podrían llegar a causar la muerte de millones de personas en el año 2050 (Sathe y col., 2023). La importancia de estudiar esta bacteria radica en que posee múltiples factores de virulencia que están implicados en las infecciones agudas y daño celular al huésped tanto animal como vegetal, es tan versátil que se encuentra distribuida en el ambiente, tales como mares, lagos, ríos, plantas, suelos incluso se ha encontrado en jabones y combustibles. Una de las características que más representa a *P. aeruginosa*, además de su amplio repertorio de factores de virulencia, es la formación de biopelículas, los cuales ayudan a la bacteria a incrementar la virulencia y la resistencia a antibióticos, lo cual ocasiona complicaciones terapéuticas ocasionando falla en los tratamientos e incluso la muerte. Además, esta bacteria es capaz de adquirir genes de resistencia y virulencia a través de la transferencia horizontal de genes (THG), proceso mediado por elementos genéticos móviles, como los plásmidos (Wang y col., 2013).

A partir de una cepa clínica de *P. aeruginosa*, fue aislado el plásmido pUM505, en un hospital de Morelia, Michoacán (Cervantes y Ohtake, 1988). Ramírez-Díaz y colaboradores, determinaron que es un replicón circular, el cual posee un tamaño de 123, 322 pb y 138 regiones codificantes. Presenta dos regiones; una región de ~67 kb que corresponde a una isla de patogenicidad (PAI) y una región de ~31 kb, la cual corresponde a una GI que tiene genes de resistencia a mercurio y cromato (Ramírez y col., 2011).

Se ha estudiado ampliamente la resistencia de metales pesados que posee el plásmido pUM505, no fue hasta que Rodríguez y colaboradores que realizaron diferentes experimentos para demostrar que pUM505 participaba en la virulencia. Para lograr esto, se llevó a cabo la transferencia del plásmido pUM505 a una cepa de *P. aeruginosa* PAO1, se realizaron ensayos de virulencia, utilizando hojas de lechugas sanas; provocando lesiones. Se cortaron las lesiones, se maceraron con una solución de sulfato de magnesio; se inocularon en placas, para así realizar el conteo de las UFC. Observaron que la cepa de *P. aeruginosa* (pUM505), producía más UFC que la cepa de *P. aeruginosa* sin el plásmido. Esto llevo a la generación de una colección de 120 clonas, las cuales se caracterizaron para determinar que genes del plásmido pUM505 estaban involucrados en el aumento de la virulencia de *P. aeruginosa*. La clona EH-26 incrementó la virulencia de *E. coli* y *P. aeruginosa* en modelos de ratón, lechuga, así como la toxicidad en líneas celulares. El análisis *in silico* indentificó que los *orfs* 92, 93 y 94 conforman a la clona EH-26; resultando que el *orf* 92, que corresponde al gen *chrB*, que codifica para la proteína ChrB; es el regulador transcripcional del operón *chrBAC* (Rodríguez y col., 2016).

La capacidad que presentan ciertos plásmidos de portar genes de resistencia y genes de virulencia es debido a diversos factores evolutivos y ambientales, siendo uno de ellos la selección co-selectiva (Bongulto y col., 2025). Cuando los plásmidos de bacterias multirresistentes se encuentran en ambientes (hospitalarios, acuáticos o agrícolas) contaminados con metales pesados, se favorece la persistencia de plásmidos que contienen genes de resistencia a dichos metales; la mayoría de veces estos contienen genes de resistencia a antibióticos o de virulencia, altamente conservados (Seiler y Berendonk, 2012). Además, la THG produce que la diseminación de plásmidos resistentes sea más rápido en bacterias y entre especies diferentes, por lo cual se incrementa la diversidad genética de las poblaciones bacterias, esto facilita que surjan cepas altamente patógenas y resistentes en ambientes hospitalarios, debido a la presión selectiva constante (Wales y Davies, 2015).

Se ha caracterizado ampliamente en el fenotipo de resistencia de la proteína ChrA, codificada por el gen *chrA*, la cual confiere un mecanismo de expulsión de oxianiones de cromato, la cual actúa por medio del potencial de membrana (Pimentel y col., 2002). Se realizaron varios análisis en donde se indica que ChrA es una proteína ancestral, perteneciente a la superfamilia CHR (Díaz-Pérez y col., 2007; Henne y col., 2009).

Aunado a esto, un análisis *in silico* sugirió que *chrA* en conjunto con los orfs 90 y 92 forman al operón *chrBA*. El *orf* 90 codifica para la proteína ChrC y el *orf* 92 codifica a la proteína ChrB, considerado como el regulador transcripcional; el operón es flanqueado por el *orf* 94 que codifica para una transposasa TnpA y por el *orf* 93 que codifica para una resolvasa TnpR (Ramírez-Díaz y col., 2012).

Siendo que el operón *chrBAC* ha sido ampliamente estudiado en el fenotipo de resistencia a cromato, y al estar involucrados con la clona EH26 (*orfs* 92, 93 y 94), la cual participa en la virulencia de *P. aeruginosa*, surgió el interés de explorar si alguno de los genes del operón *chrBAC* está involucrado en el aumento de la virulencia de *P. aeruginosa*.

Los ensayos de virulencia de los genes individuales del operón *chrBAC*, en el nematodo *C. elegans*, mostraron que *chrA*, que codifica para la proteína ChrA, aumenta la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1; mientras que los genes *chrB* y *chrC* no incrementan la virulencia. Lo cual es interesante, ya que ChrA al ser una proteína de membrana y estar altamente relacionada en la expulsión a cromato, podría estar secretando moléculas que aumenten la virulencia, teniendo una doble función. Estudios previos han demostrado que genes ampliamente asociados a la resistencia de ciertos compuestos, ya sea antibióticos o metales pesados, pueden estar relacionados con la expulsión de factores de virulencia, un ejemplo de esto es el sistema AcrAB-TolC de *E. coli* que es una bomba de eflujo tripartita, que utiliza la

energía del gradiente de protones para expulsar antibióticos β -lactámicos, tetraciclinas, macrólidos y fluoroquinolonas. Aunado a que expulsa autoinductores de señalización de QS como AI-2 y AI-3, los cuales regulan la expresión de adhesinas y toxinas (Hirakawa y col., 2003; Lee y Lee, 2009). Otro ejemplo es MexaB-OprM, es una bomba de eflujo tripartita de la familia RND en *P. aeruginosa*, que además de expulsar una gran variedad de antibióticos como quinolonas, tetraciclinas o β -lactámicos, expulsa moléculas de señalización de QS como 3-oxo-C12-HSL, que modulan la expresión de diferentes genes regulados por QS. Por lo cual no sería extraño que ChrA tenga otra función además de la resistencia a cromato.

En múltiples bacterias Gram-negativas se encuentran diversos sistemas de expulsión de antibióticos y factores de virulencia, como los pertenecientes a las superfamilias de bombas de eflujo RND y MFS; las cuales se ha demostrado fuertemente relacionadas con el potencial de membrana, utilizando la fuerza motriz de protones generados por el mismo potencial de membrana; además, de expulsar diferentes antibióticos, también están relacionados con la expulsión de múltiples factores de virulencia (Gaurav y col., 2023).

Al sugerir que ChrA se encuentra expulsando moléculas relacionadas con el aumento de la virulencia de *P. aeruginosa*, se realizaron experimentos de toxicidad en *C. elegans*; con el fin de determinar si el sobrenadante poseía actividad virulenta. Demostrando que ChrA el sobrenadante de los cultivos de las bacterias que poseen al gen *chrA* son más tóxicos, lo que sugiere que ChrA expulsa alguna molécula que actúa como un factor de virulencia, al observar que un mayor porcentaje de los nematodos inoculados murieron en comparación a los inoculados con los sobrenadantes de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. ChrA depende del potencial de membrana para la expulsión del cromato, por lo cual fue de interés añadir al medio agentes que abatieran el potencial de membrana como la N-acetilcisteína (N-AC) y el cianuro de potasio (KCN). Los nematodos inoculados con la cepa de *P.*

aeruginosa (pUC_ *chrA*) crecida en presencia de N-AC o KCN mostraron un comportamiento similar al de los nematodos inoculados con la cepa control de *P. aeruginosa* PAO1, manteniendo un porcentaje de sobrevivencia mayor que el de los nematodos inoculados sin estos agentes. Indicando que el potencial de membrana también es importante para el fenotipo de virulencia conferido por *ChrA*, sugiriendo un mecanismo de expulsión de moléculas que incrementan la virulencia.

Se ha demostrado que N-AC al entrar a las células bacterianas, puede aumentar la producción de las especies reactivas (ROS), generando daño celular y muerte bacteriana (Costa y col., 2017). Por otro lado, el KCN se ha relacionado con inhibir la cadena de transporte de electrones (CTE) de bacterias como *P. aeruginosa*, afectando el potencial de membrana, afectando diversas funciones esenciales para la célula bacteriana (Yan y col., 2019). Lo que sugiere que *ChrA* además de requerir el potencial de membrana para la expulsión de iones cromato; también es dependiente al potencial de membrana para secretar moléculas relacionadas al aumento de la virulencia.

Se ha descrito la relación de las bacterias con el sistema de QS, un conjunto de sistemas que permiten la comunicación entre las células bacterianas, mediado por la concentración de moléculas difusibles, conocidas como autoinductores (Jiménez y col., 2012). En *P. aeruginosa* se han encontrado dos sistemas de QS que producen moléculas autoinductoras AHL: Las y Rhl. Ambos sistemas actúan jerárquicamente, el sistema Las, es el mayor de la jerarquía y controla la producción de múltiples factores de virulencia, entre ellos a LasA, LasB, ToxA, AprA, hemolisinas y proteasa alcalina; además de activar a los sistemas de Rhl y PQS (Diggle y col., 2007; Shah y col., 2019). El siguiente sistema es Rhl, el cual regula la expresión de varios genes que son los responsables de la producción de ramnolípidos, además de genes involucrados en el ensamblaje y función del sistema de secreción tipo 3, uno de los mayores determinantes de las infecciones, ya que libera proteínas tóxicas dentro de las células del huésped (Bleves y col., 2005).

Muchos sistemas QS de patógenos bacterianos; producen y liberan pequeñas señales químicas conocidas como autoinductores, los cuales están asociados a la regulación de genes que codifican la producción de factores de virulencia (Bassler, 2009; Deng y col., 2011). En *P. aeruginosa*, *lasI* sintetiza para el primer autoinductor, N-3-oxo-homoserina lactona (3-oxo-C12-AHL), mientras que *rhII* sintetiza al segundo autoinductor N-butirilhomoserina lactona (C4-AHL) (Pearson y col., 1994).

La transferencia del gen *chrA* a la mutante *lasI* y a la doble mutante *lasI/rhII* de *P. aeruginosa* PAO1 determinó que *chrA* incrementa la resistencia a cromato; además de incrementar la virulencia en el nematodo de *C. elegans*, tanto en la mutante sencilla *lasI* y la doble mutante *lasI/rhII*, sugiriendo que el QS no regula directamente a *chrA* en el fenotipo de virulencia y de resistencia a cromato, pero no se descarta que *ChrA* podría estar regulada bajo otro sistema. Se han encontrado diferentes genes que codifican factores relacionados con la virulencia que no son regulados directamente por QS. El gen *algD* de *P. aeruginosa*, relacionado en la biosíntesis de alginato, es regulado por el factor sigma AlgU (Rajabi y col., 2022); otro ejemplo es el gen *phuR*, encargado de la captación de hierro del huésped que es controlado por el regulador Fur (Pasqua y col., 2017).

Por otro lado, la transferencia del gen *chrA* al huésped heterólogo de *E. coli* JM101 mostro que *ChrA* no es funcional en este fondo genético, ya que es altamente sensible a cromato al igual que la cepa control. De manera similar el gen *chrA* no confirió un incremento en la virulencia de la bacteria, los ensayos de virulencia mostraron un comportamiento similar al de la cepa de *E. coli* JM101 sin *chrA*. Se ha descrito que la HGT, permite a las bacterias obtener capacidades diferentes; ya sea de resistencia, metabolizar compuestos tóxicos e incluso aumentar la virulencia. Siendo que las proteínas de membrana necesitan de la integración precisa en la bicapa lipídica y la interacción coordinada con otras proteínas, al transferir genes que codifiquen proteínas de membrana, pueden perder su funcionalidad en otro huésped; esto debido a incompatibilidades estructurales, bioquímicas o regulatorias

en las bacterias receptoras (Ochman y col., 2000). Un ejemplo claro es el complejo AcrAB-TolC es una bomba de eflujo de múltiples fármacos; la transferencia de los genes *acrB* a bacterias que no poseían una proteína TolC funcional, por lo cual se dio en la pérdida de función (Zgurskaya y col., 2000). Otro ejemplo es *fhuA*, la cual codifica a una porina que capta sideróforos férricos, esta proteína es funcional en *E. coli*, pero al ser transferida a otras bacterias Gram-negativas no muestra función (Braun y col., 1999). Se podría sugerir que el gen *chrA* de *P. aeruginosa* al ser transferido a una cepa de *E. coli* podría estar perdiendo su función, al no ser compatibles estructuralmente.

Múltiples factores de virulencia secretados por bacterias, son de naturaleza proteica, por lo cual pueden ser desnaturalizados e inactivados por medio de tratamientos; ya sean enzimáticos o térmicos. Estos factores se desnaturalizan al alterar la estructura tridimensional, produciendo que se pierda su función. Por lo cual para entender un poco más acerca de la naturaleza de las moléculas secretadas por ChrA, se realizaron experimentos en los que el sobrenadante de los cultivos fue tratado con calor o proteasas.

Se analizó si alguna de las moléculas, o molécula, perdían su actividad virulenta al someterse a un tratamiento enzimático utilizando la proteasa Pronasa R. Los resultados mostraron que la actividad tóxica se pierde después de los tratamientos. Lo cual sugiere que las moléculas secretadas por ChrA se hidrolizan por la actividad de la Pronasa R. Las proteasas rompen los enlaces peptídicos, desnaturalizando e inactivando diversos factores de virulencia de naturaleza proteica.

Al someter los sobrenadantes a calentamiento, las bacterias con *chrA* mostraron un comportamiento avirulento, similar al de los controles negativos de la virulencia; lo cual sugiere que la(s) molécula(s) secretada(s) poseen naturaleza proteica, ya que al ser desnaturalizadas se provoca la pérdida de la función. Hay varios factores de virulencia secretados por las bacterias que son altamente sensibles a las altas temperaturas; un ejemplo de esto, es la toxina diftérica, producida por

Corynebacterium diphtheriae, la cual pierde su toxicidad al tratarse a temperaturas de 56-60°C, durante 30 min (Parveen y col., 2019). Otro ejemplo, es la toxina tetánica de *Clostridium tetani*, que también se desnaturaliza con calor, esta forma se conoce como toxoide tetánico, carece de toxicidad, pero aún conserva su inmunogenicidad, lo que la hace adecuada para su uso en vacunas (Rappuoli y col., 2018). Además, se ha reportado que la temperatura es clave para diversas bacterias, el cual activa o reprime la expresión de múltiples genes relacionados con la virulencia (Lam y col., 2014).

En resumen, este es el primer estudio en donde se reporta la doble función de la proteína ChrA en la resistencia a cromato y en la virulencia, sugiriendo que la proteína ChrA secreta moléculas de naturaleza proteica que actúan como factores de virulencia y que este mecanismo no es controlado por el QS.

X. Conclusión

La proteína ChrA del plásmido pUM505 además de conferir resistencia al ion toxico cromato participa en la virulencia de *P. aeruginosa*.

XI. Bibliografía

- Al-Wrafy, F. A., Alariqi, R., Noman, E. A., Al-Gheethi, A. A., & Mutahar, M. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* behaviour in polymicrobial communities: The competitive and cooperative interactions conducting to the exacerbation of infections. *Infection. Genetics and Evolution*. 110: 105387.
- Álvarez, H.D.A., Garza, M.G.S., Vázquez, L.R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Rev Chil Infectol*. 32(5): 499-504.
- Arora, S. K., Bangera, M., Lory, S., & Ramphal, R. (2001). A genomic island in *Pseudomonas aeruginosa* carries the determinants of flagellin glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(16): 9342–9347.
- Battle, S. E., Meyer, F., Rello, J., Kung, V. L. y Hauser, R. (2008). Hybrid pathogenicity island PAGI-5 contributes to the highly virulent phenotype of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in mammals. *J. Bacteriol*. 190: 7130-7140.
- Bleves, S., Soscia, C., Nogueira-Orlandi, P., Lazdunski, A. y Filloux, A. (2005). Quorum sensing negatively controls type secretion regulon expression in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol*. 187: 3898-3902.
- Braun, V., & Killmann, H. (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *Trends in Biochemical Sciences*. 24(3): 104–109.
- Bouteiller, M., Dupont, C., Bourigault, Y., Latour, X., Barbey, C., Konto-Ghiorgi, Y., & Merieau, A. (2021). *Pseudomonas flagella*: Generalities and specificities. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(7): 3337.

- Cervantes, C., & Ohtake, H. (1988). Plasmid-determined resistance to chromate in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 56(2): 173–176.
- Chung, J. W., Piao, Z.-H., Yoon, S. R., Kim, M. S., Jeong, M., Lee, S. H., Min, J. K., Kim, J. W., Cho, Y.-H., Kim, J. C., Ahn, J. K., Kim, K. E., & Choi, I. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* eliminates natural killer cells via phagocytosis-induced apoptosis. *PLoS Pathogens*. 5(8), e1000561.
- Chung, J., Eisha, S., Park, S., Morris, A. J., & Martin, I. (2023). How three self-secreted biofilm exopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*, Psl, Pel, and alginate, can each be exploited for antibiotic adjuvant effects in cystic fibrosis lung infection. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(10): 8709.
- Costa, F., Sousa, D.M., & Parreira, P. (2017). N-acetylcysteine-functionalized coating avoids bacterial adhesion and biofilm formation. *Sci Rep*. 7: 17374.
- Diggle, S. P., & Whiteley, M. (2020). Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*, 166(1): 30–33.
- Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Lamont, I. L., Kong, X., Hider, R. C., Cornelis, P., Cmara, M. y Williams, P. (2007). The *Pseudomonas aeruginosa* 4-quinolone signal molecules HHQ and PQS play multifunctional roles in quorum sensing and iron entrapment. *Chemistry and Biology*. 14(1):87–96.
- Faezi, S., Bahrmand, A. R., Sardari, S., Nikokar, I., Khanaki, K., Siadat, S. D., Goudarzi, G., Elmi, A., & Mahdavi, M. (2020). Epitope-based immunoinformatics study of a novel PilQ380–706-PilA fusion protein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis*. 147: 104263.
- Fajardo, A., Martínez-Martín N., Mercadillo, M., Gal, J., Ghysels, B., Matthijs, S., Cornelis, P., Wiehlmann, L., Tümmler, B., Baquero, F. y Martínez, J. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One*. 3: 1619.
- Gambello, M., Kaye, S. e Iglewski, B. (1993). LasR of *Pseudomonas aeruginosa* is a transcriptional activator of the alkaline protease gene (*apr*) and an enhancer of exotoxin A expression. *Infect. Immun*. 61: 1180-1184.
- Gaurav, A., Bakht, P., Saini, M., Pandey, S., & Pathania, R. (2023). Role of bacterial efflux pumps in antibiotic resistance, virulence, and strategies to discover novel efflux pump inhibitors. *Microbiology*. 169(5): 1333.
- Grant, C. C., & Vasil, M. L. (1986). Analysis of transcription of the exotoxin A gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 168(3): 1112–1119.

- Hachani, A., Lossi, N. S., Hamilton, A., Jones, C., Bleves, S., Albesa-Jové, D., & Filloux, A. (2011). Type VI secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*: Secretion and multimerization of VgrG proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 286(14): 12317–12327.
- Hardalo, C., Edberg, S.C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol*. 23(1):47-75.
- Henderson, I. R., Navarro-García, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4): 692–744.
- Henne, K.L., Nakatsu, C.H., Thompson, D.K., & Konopka, A.E. (2009). High-level chromate resistance in *Arthrobacter* sp. strain FB24 requires previously uncharacterized accessory genes. *BMC Microbiology*. 9:199.
- Hirakawa, H., Nishino, K., Yamada, J., Hirata, T., & Yamaguchi, A. (2003). Beta-lactam resistance modulated by the overexpression of response regulators of two-component signal transduction systems in *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52(4): 576–582.
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979). Chromosomal genetics of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett*. 56: 173-176.
- Iglewski, B., Rust, L. & Bever, R. (1990). In *Pseudomonas*: Biotransformations, Pathogenesis and Evolving Biotechnology. *Am. Soc. Microbiol*. 36-43.
- Jiménez, P., Koch G., Thompson J., Xavier, K., Cool, R. & Quax, W. (2012). The Multiple Signaling Systems Regulating Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol and Mol. Biol. Rev*. 76: 46-65.
- Jones, S., Yu B., Baintoni, N., Birdsall. M., Bycroft, B., Chhabra, S., Cox, A., Golby, P., Reeves, P. & Stephens, S. (1993). The lux autoinducer regulates the production of exoenzyme virulence determinants in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas aeruginosa*. *EMBO J*. 2477-2482.
- Kipnis, E., Sawa, T., & Wiener-Kronish, J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 36(2): 78–91.
- Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C. F., Stanke, F., Larbig, K. D., Heeb, S., Schöck, U., Pohl, T. M., Wiehlmann, L., & Tümmler, B. (2010). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *Journal of Bacteriology*. 192(4): 1113–1121.

- Lam, O., Wheeler, J., & Tang, C. M. (2014). Thermal control of virulence factors in bacteria: a hot topic. *Virulence*. 5(8): 852–859.
- Lee, J. H., & Lee, J. (2009). Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4): 426–444.
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784): 299–304.
- Pace, N. R. (1997). A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276: 139-144.
- Parveen, S., Bishai, W. R., & Murphy, J. R. (2019). *Corynebacterium diphtheriae*: Diphtheria Toxin, the tox Operon, and Its Regulation by Fe²⁺ Activation of apo-DtxR. *Microbiology Spectrum*. 7(4).
- Pasqua, M., Visaggio, D., Lo Sciuto, A., Genah, S., Banin, E., Visca, P., Qin, S., Xiao, W., Zhou, C., Pu, Q., Deng, X., Lan, L., Liang, H., Song, X., & Wu, M. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 7(1): 199.
- Pasqua, M., Visaggio, D., Lo Sciuto, A., Genah, S., Banin, E., Visca, P., & Imperi, F. (2017). Ferric uptake regulator Fur is conditionally essential in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7: 163.
- Pearson, J., Passador, L., Iglewski, B. & Greenberg, E. (1995). A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 92: 1490-1494.
- Persat, A., Inclan, Y. F., Engel, J. N., Stone, H. A., & Gitai, Z. (2015). Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(24): 7563–7568.
- Pesci, E. & Iglewski B. (1997). The chain of command in *Pseudomonas* quorum-sensing. *Trends Microbiol*. 4: 132-134.
- Pimentel, B. E., Moreno-Sánchez, R., & Cervantes, C. (2002). Efflux of chromate by *Pseudomonas aeruginosa* cells expressing the *ChrA* protein. *FEMS Microbiology Letters*. 212(2): 249–254.
- Pritchard, A. & Vasil, M. (1986). *Pseudomonas*: molecular biology and biotechnology. *Bacteriol*. 176: 291-298.

- Rahme, L. G., Ausubel, F. M., Cao, H., Drenkard, E., Goumnerov, B. C., Lau, G. W., Mahajan-Miklos, S., Plotnikova, J., Tan, M. W., Tsongalis, J., Walendziewicz, C. L., & Tompkins, R. G. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(16): 8815–8821.
- Rajabi, H., Salimizand, H., Khodabandehloo, M., Fayyazi, A., & Ramazanzadeh, R. (2022). Prevalence of *algD*, *pslD*, *pelF*, *PpgI*, and *PAPI-1* genes involved in biofilm formation in clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. *BioMed Research International*. 8:1716087.
- Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V., Johnstone, L., Cervantes, C. & Rensing, C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal genes. *Plasmid*. 66: 7-18.
- Rampioni, G., Shuster M., Greenberg, E., Bertani, I., Grasso, M., Venturi V., Zennaro, E. & Leoni, L. (2007). RsaL provides quorum sensing homeostasis and functions as a global regulator of gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol*. 66: 1577-1565.
- Rappuoli, R., Pizza, M., & Podda, A. (2018). Biophysical comparison of diphtheria and tetanus toxins with the formaldehyde-detoxified toxoids, the main components of diphtheria and tetanus vaccines. *PLoS ONE*, 13(2).
- Rodríguez-Andrade, E., Hernández-Ramírez, K. C., Díaz-Pérez, S. P., Díaz-Magaña, A., Chávez-Moctezuma, M. P., Meza-Carmen, V., Ortiz-Alvarado, R., Cervantes, C., & Ramírez-Díaz, M. I. (2016). Genes from *pUM505* plasmid contribute to *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Antonie van Leeuwenhoek*, 109(3): 389–396.
- Rojas, M. M. (2011). Quorum sensing en la asociación beneficiosa de las bacterias con las plantas. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13(2): 135-143.
- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in *ESKAPE* pathogens. *BioMed Research International*. 2016: 2475067.
- Sathe, N., Beech, P., Croft, L., Suphioglu, C., Kapat, A., & Athan, E. (2023). *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and novel approaches to treatment “Knowing the enemy” the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment. *Infectious Medicine (Beijing)*. 2(3): 178–194
- Seiler, C., & Berendonk, T. U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology*. 3: 399.

- Shah, S., Gaikwad, S., Nagar, S., Kulshrestha, S., Vaidya, V., Nawani, N., & Pawar, S. (2019). Biofilm inhibition and anti-quorum sensing activity of phytosynthesized silver nanoparticles against the nosocomial pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*. 35(1): 34–49.
- Shah, M. D., Kharkar, P. S., Sahu, N. U., Peerzada, Z., & Desai, K. B. (2022). Correction: Potassium 2-methoxy-4-vinylphenolate: a novel hit exhibiting quorum-sensing inhibition in *Pseudomonas aeruginosa* via LasIR/RhlIR circuitry. *RSC Advances*. 12(22): 13958.
- Shortridge, V., Lazdunski, A. & Vasil M. (1992). Osmoprotectant and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol*. 6: 863-871
- Sinha, M., Ghosh, N., Wijesinghe, D. S., Mathew-Steiner, S. S., Das, A., Singh, K., El Masry, M., Khanna, S., Inoue, H., Yamazaki, K., Kawada, M., Gordillo, G. M., Roy, S., & Sen, C. K. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* theft biofilm require host lipids of cutaneous wound. *Annals of Surgery*. 276(6): 744–751.
- Stover C., Pham X., Erwin A., Mizoguchi S., Warrenner P., Hickey M., Brinckman F., Hufnagle W., Kowalik D. & Lagrou M. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406: 959-964.
- Toyofuku, M., Nobuhiko N., Tatsuya F., Naoki T., Hideaki M., Isao S., Toshiaki N. & Hiroo U. (2007). Quorum Sensing Regulates Denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*. 189(13):4969–72.
- Tran Thi, M. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(22): 8671.
- Vetrivel, A., Ramasamy, M., Vetrivel, P. & Murugesan, R. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and its control. *Biologics*. 1(3): 312–336.
- Wales, A. D., & Davies, R. H. (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 4(1): 1–13.
- Waters, M. W. & Bassler, B. L. (2005). Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21:319–46.
- Yan, H., Asfahl, K. L., Li, N., Sun, F., Xiao, J., Shen, D., Dandekar, A. A., & Wang, M. (2019). Conditional quorum-sensing induction of a cyanide-insensitive terminal oxidase stabilizes cooperating populations of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature Communications*. 10: 2834.

Zgurskaya, H. I., & Nikaido, H. (2000). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular*

Brenda Valerio Arellano

Caracterización funcional de los genes chr del plásmido pUM505 en la virulencia de Pseudomonas aeruginosa.pdf

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:595038929

Fecha de entrega

27 may 2026, 10:52 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

27 may 2026, 11:19 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

Caracterización funcional de los genes chr del plásmido pUM505 en la virulencia de Pseudomona....pdf

Tamaño del archivo

3.4 MB

77 páginas

16.001 palabras

84.435 caracteres

24% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 24%  Fuentes de Internet
- 9%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
55 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



A quien corresponda,

Por este medio, quien abajo firma, bajo protesta de decir verdad, declara lo siguiente:

- Que presenta para revisión de originalidad el manuscrito cuyos detalles se especifican abajo.
- Que todas las fuentes consultadas para la elaboración del manuscrito están debidamente identificadas dentro del cuerpo del texto, e incluidas en la lista de referencias.
- Que, en caso de haber usado un sistema de inteligencia artificial, en cualquier etapa del desarrollo de su trabajo, lo ha especificado en la tabla que se encuentra en este documento.
- Que conoce la normativa de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular los Incisos IX y XII del artículo 85, y los artículos 88 y 101 del Estatuto Universitario de la UMSNH, además del transitorio tercero del Reglamento General para los Estudios de Posgrado de la UMSNH.

Datos del manuscrito que se presenta a revisión

Programa educativo	Maestria en Ciencias en Biología Experimental	
Título del trabajo	Caracterización funcional de los genes chr del plásmido pUM505 en la virulencia de Pseudomonas aeruginosa	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Brenda Valerio Arellano	1505677@umich.mx
Director	D.C. Martha Isela Ramírez Díaz	martha.ramirez@umich.mx
Codirector		
Coordinador del programa	D.C. Mauro Manuel Martinez Pacheco	mauro.martinez.pacheco@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial

Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	NO	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

Coordinación General de Estudios de Posgrado
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Uso de Inteligencia Artificial

Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	NO	
Traducción a otra lengua	NO	
Revisión y corrección de estilo	NO	
Análisis de datos	NO	
Búsqueda y organización de información	NO	
Formateo de las referencias bibliográficas	NO	
Generación de contenido multimedia	NO	
Otro	NO	

Datos del solicitante

Nombre y firma	Brenda Valerio Arellano
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán, 27 de Mayo del 2026