



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**“ESTUDIO DEL EFECTO DEL SUERO SANGUÍNEO EN LA  
VIRULENCIA CONFERIDA POR EL PLASMIDO pUM505”**

## **TESIS**

**Para obtener el título de:**

**Química Farmacobióloga**

**Presenta:**

**p.Q.F.B. Mitzi Dayán Magaña Cornejo**

**Asesora:**

**D.C. Martha Isela Ramírez Díaz**

**Co-asesor:**

**D.C. Víctor Meza Carmen**

**Morelia, Michoacán, junio 2022**

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DE LA D.C. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ Y COASESORÍA DEL D. C. VÍCTOR MEZA CARMEN.

## **Dedicatoria**

Me gustaría dedicar mi tesis principalmente a mis padres José Manuel Magaña Castillo y María Guadalupe Cornejo Torres por su inmenso amor, comprensión y apoyo incondicional a lo largo de la carrera y porque siempre he sentido la seguridad de que se merecen cada uno de mis logros en especial este.

A Dios por permitirme concluir mi carrera de manera satisfactoria.

A mis hermanos Valeria y Adair que han sido inspiración y motivo para la terminación de mi licenciatura y tesis.

A mi mejor amiga Ingrid por su apoyo, consejos y estar conmigo en cada momento crítico y bueno de la licenciatura.

A mi novio José Fernando por acompañarme a lo largo de este camino, por su amor, por ser mi fuente de fortaleza e impulsarme a concluir.

A todos ellos muchas gracias de todo corazón.

## **Agradecimientos**

A mi asesora la D.C. Martha Isela Ramírez Díaz por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis en el laboratorio y por los conocimientos y apoyo que me brindó durante la realización de este, a mi co-asesor el D.C. Víctor Meza Carmen por proporcionarme las herramientas para llevar a cabo este proyecto.

A mis revisores de tesis:

D.C. Rafael Ortiz Alvarado

Q.F.B. Herminia Hernández Ibarra

M.C. Martha Patricia Chávez Moctezuma

D.C. Marco Iván Valle Maldonado

D.C. Consuelo de Jesús Cortés Penagos

A mis compañeros de laboratorio:

A la D.C. Karen principalmente, a la M.C. Bianca Yareli y a mi compañera Q.F.B. Brenda por toda su ayuda.

## ÍNDICE

I.	ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
II.	ÍNDICE DE TABLAS.....	9
III.	RESUMEN.....	10
IV.	ABSTRACT .....	12
V.	INTRODUCCIÓN.....	13
	Generalidades de las bacterias.....	13
	Clasificación de las bacterias .....	13
	Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
	Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i> .....	15
	Plásmidos .....	17
	Plásmido pUM505.....	19
	Generalidades de virulencia.....	20
	Composición de la sangre .....	24
	Suero sanguíneo .....	25
	Efecto del suero sanguíneo en la virulencia de microorganismos .....	25
VI.	ANTECEDENTES .....	28
VII.	JUSTIFICACIÓN .....	32
VIII.	HIPOTESIS .....	33
IX.	OBJETIVO GENERAL.....	34
X.	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	34
XI.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	35
XII.	MATERIALES Y METODOS .....	36
	Medios de cultivo .....	36
	Cepas .....	36
	Sueros .....	37
	Cultivos celulares y obtención de extractos libre de células .....	37
	Virulencia en el modelo de nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	37
XIII.	RESULTADOS .....	39
	Efecto del suero nativo y el suero desnaturalizado en el crecimiento de PAO1 pUM505 .....	39

Virulencia de <i>P. aeruginosa</i> pUM505.....	41
Efecto del suero sanguíneo nativo o desnaturalizado en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> pUM505 .....	41
Efecto de la desnaturalización del suero sanguíneo nativo en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> pUM505.....	44
Efecto del tiempo de desnaturalización del suero en la regulación de la de <i>P. aeruginosa</i> pUM505.....	44
Ensayo de virulencia de PAO1 con la toxina PumA, la antitoxina PumB y la toxina-antitoxina PumAB con suero nativo .....	48
Efecto del suero desnaturalizado en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 conteniendo los genes <i>pumA</i> , <i>pumB</i> o el operón <i>pumAB</i> .....	52
Virulencia de sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>pumA</i> , <i>pumB</i> o <i>pumAB</i> de cultivos crecidos en presencia de suero nativo al 10%....	56
Ensayo de virulencia de PAO1 con el sobrenadante de la toxina PumA, la antitoxina PumB y la toxina-antitoxina PumAB con suero desnaturalizado al 10%.....	58
XIV. DISCUSIÓN.....	60
XV. CONCLUSIÓN.....	65
XVI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa genético del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i> .....	22
<b>Figura 2.</b> Virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 y <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pUM505 en un modelo de infección de hojas de lechuga.....	23
<b>Figura 3.</b> Suero sanguíneo y sangre coagulada.....	27
<b>Figura 4.</b> Arreglo genético del operón <i>pumAB</i> del plásmido pUM505.....	30
<b>Figura 5.</b> Invasividad de <i>P. aeruginosa</i> en presencia y ausencia de los genes <i>pumA</i> y <i>pumB</i> en el pulmón del ratón.....	31
<b>Figura 6.</b> Virulencia de <i>P. aeruginosa</i> pUM505.....	42
<b>Figura 7.</b> Virulencia de <i>P. aeruginosa</i> pUM505 en presencia de suero sanguíneo.....	43
<b>Figura 8.</b> Virulencia de <i>P. aeruginosa</i> pUM505 en presencia de suero sanguíneo desnaturalizado.....	46
<b>Figura 9.</b> Efecto del tiempo de desnaturalización del suero sanguíneo en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> pUM505.....	47
<b>Figura 10.</b> Efecto de la adición de 10% de suero sanguíneo en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> con los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505.....	50
<b>Figura 11.</b> Efecto de la adición de 20% de suero sanguíneo en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> con los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505.....	51
<b>Figura 12.</b> Efecto de la adición de 10% de suero sanguíneo desnaturalizado en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> con los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505.....	54

**Figura 13.** Efecto de la adición de 20% de suero sanguíneo desnaturalizado en la virulencia de *P. aeruginosa* con los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505.....55

**Figura 14.** Efecto del sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* crecidas en presencia de suero nativo en la sobrevivencia de *C. elegans*.....57

**Figura 15.** Efecto del sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* crecidas en presencia de suero desnaturalizado en la sobrevivencia de *C. elegans*.....59

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Crecimiento de *P. aeruginosa* pUM505 en medio de cultivo M9 en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de suero nativo o desnaturalizado .....40

## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista, Gram negativa, ubicua, porque se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente, ya que la podemos encontrar tanto en suelo como en agua. Es considerada una de las bacterias patógenas de mayor resistencia a antibióticos según la Organización Mundial de la Salud (OMS). *P. aeruginosa* ha generado numerosas investigaciones en los últimos años por su capacidad de producir infecciones en pacientes inmunocomprometidos y debido a esto se ha clasificado como una de las bacterias con mayor importancia en el ámbito médico, ya que es una de las responsables de la mayoría de las infecciones intrahospitalarias. El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa*, que al ser transferido a otras bacterias confiere virulencia, esto se debe a que posee una isla de patogenicidad denominada PAI donde se encuentran genes que participan en la virulencia. En la isla PAI de pUM505 se encuentran los genes *pumA* (que codifica a la toxina PumA) y el gen *pumB* (que codifica a la antitoxina PumB) los cuales forman parte de un sistema de Toxina-Antitoxina (TA) denominado PumAB. La toxina PumA es capaz de incrementar la virulencia de *P. aeruginosa* en hoja de lechuga, el nematodo *Ceanorharbitis elegans* y en ratón, efecto que es neutralizado por la antitoxina. Aunado a esto, se ha descrito que el suero sanguíneo puede modular la virulencia de los organismos. Se ha demostrado que la presencia de suero sanguíneo aumenta la virulencia del hongo *Mucor circinelloides* mientras que, en *Staphylococcus aureus* el suero sanguíneo regula la expresión de genes de virulencia. El objetivo de este proyecto fue determinar si la presencia del suero sanguíneo (suero nativo) y el suero desnaturalizado tiene algún

efecto en la virulencia conferida por el plásmido pUM505 y por los genes *pumA* y *pumB* del sistema toxina-antitoxina PumAB.

**Palabras clave:** *P. aeruginosa*, virulencia, elemento genético móvil, toxina, suero sanguíneo.

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic Gram-negative pathogenic bacterium, ubiquitous because it is widely distributed in the environment, it can be found both in soil and in water. It is considered one of the pathogenic bacteria with the highest resistance to antibiotics according to the World Health Organization (WHO). *P. aeruginosa* has generated numerous investigations in recent years due to its ability to cause infections in immunocompromised patients and due to this it has been classified as one of the most important bacteria in the medical field, since it is one of those responsible for most of nosocomial infections. Plasmid pUM505 was isolated from a clinical strain of *P. aeruginosa*, which, when transferred to other bacteria, confers virulence, this is because it has a pathogenicity island called PAI where genes involved in virulence are found. In the PAI island of pUM505, the *pumA* genes (encoding the PumA toxin) and the *pumB* gene (encoding the PumB antitoxin) which are part of a Toxin-Antitoxin (TA) system called PumAB. The PumA toxin is capable of increasing the virulence of *P. aeruginosa* in lettuce leaves, the nematode *Ceanorharbitis elegans* and in mice, an effect that is neutralized by the antitoxin. In addition to this, it has been described that blood serum can modulate the virulence of organisms. It has been shown that the presence of blood serum increases the virulence of the fungus *Mucor circinelloides*, while in *Staphylococcus aureus* blood serum regulates the expression of virulence genes. The objective of this project was to determine if the presence of blood serum (native serum) and denatured serum has any effect on the virulence conferred by the pUM505 plasmid and by the *pumA* and *pumB* genes of the PumAB toxin-antitoxin system.

## INTRODUCCIÓN

### Generalidades de las bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) de largo (entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, bastones y espirales (Marcano, 2008). Se estima que hay alrededor de 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce (Marcano, 2008). Una de las propiedades más notorias de las bacterias es su inmensa capacidad para adaptarse a los diversos ambientes, siendo organismos ubicuos que se han encontrado en todo hábitat de la tierra (Marcano, 2008). Los sitios más hostiles imaginables hospedan a una amplia diversidad bacteriana siendo las bacterias los organismos más abundantes del planeta (Cervantes, 2019).

### Clasificación de las bacterias

Las bacterias se pueden clasificar de diferentes maneras, por ejemplo: por su forma, tamaño, estructura, sus actividades químicas o metabólicas, por el tipo de nutrientes que necesitan, por la energía que usan y por las condiciones físicas que necesitan para crecer (Singleton, 1999). Una manera ampliamente difundida para clasificar a las bacterias es con base a la composición de su pared celular, generando 2 grupos bacterianos: las llamadas Gram positivas y Gram negativas (Murray y col., 2014). Por ejemplo, las bacterias Gram positivas se diferencian de las Gram negativas en la estructura de la pared celular y en sus componentes y sus funciones en donde el peptidoglucano que es el elemento que proporciona rigidez a la pared celular, también determina la forma (Murray y col., 2014).

Una bacteria Gram positiva posee una pared celular gruesa que está formada principalmente por peptidoglucano que rodea la membrana citoplásmica, estas bacterias contienen ácidos teicoicos y lipoteicoicos (Murray y col., 2014).

Las paredes celulares de las bacterias Gram negativas son más complejas, ya que contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplásmica (Murray y col., 2014). Inmediatamente por fuera de la membrana citoplásmica se encuentra una delgada capa de peptidoglucano que representa tan sólo un 5% a 10% del peso de la pared celular (Murray y col., 2014). Además, que la pared celular de las Gram negativas no contiene ácidos teicoicos ni lipoteicoicos (Murray y col., 2014).

### Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* fue descubierta por Walter Migula del Instituto Karlsruhe en Alemania (Paz-Zarza y col., 2019). El cual la describía como “células con órganos polares” (Paz-Zarza y col., 2019). La etimología del término “aeruginosa” lo acuñó el investigador Schroeter en 1872, esto porque al ser cultivada la bacteria de *Pseudomonas* las colonias muestran un color azul-verdoso (Paz-Zarza y col., 2019). Posteriormente al compuesto que genera este color característico de *Pseudomonas* se le denominó piocianina, sin embargo, ha sido reportado que algunas especies del género de *Pseudomonas* no producen piocianina (Paz-Zarza y col., 2019). Muchas cepas de *P. aeruginosa* también producen el pigmento fluorescente llamado pioverdina, que le confiere un color verdoso al agar, mientras que algunas cepas producen un pigmento rojo oscuro de nombre piorrubina o el pigmento negro piomelanina (Brooks, 2008).

*P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa en forma bacilo, esta es considerada un patógeno oportunista, se encuentra distribuida en el medio ambiente como el suelo y agua (Ramírez-Díaz y col., 2011). *P. aeruginosa* es un microorganismo capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno y puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes, así como crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C (Ochoa y col., 2013). Estas características, además de otros factores, le permiten adherirse, sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias (Ochoa y col., 2013), ocasionado que *P. aeruginosa* sea un microorganismo patógeno de humanos y sea la fuente principal de infecciones en pacientes con defensas anormales (Brooks, 2008).

#### Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

*P. aeruginosa* en respuesta a varios estímulos ambientales en diferentes sitios de infección, coordina la producción de diferentes factores de virulencia y la formación de biopelículas a través de una red complicada de sistemas jerárquicos de detección dependiente de la densidad celular, denominado percepción de quorum (en inglés quorum sensing QS) (Lasa y col., 2005). La comunicación se logra a través de moléculas señalizadoras de N-acil homoserina lactonas (AHL) difusibles denominadas autoinductores (Kruczeky y col., 2014). *P. aeruginosa* posee dos sistemas QS bien caracterizados, el sistema LasI/LasR y el sistema RhII/RhIR que están organizados jerárquicamente, siendo el sistema LasI quien controla toda la cascada del QS. (Kruczeky y col., 2014). Cada sistema de QS consta de un activador transcripcional (LasR, RhII/RhIR) y una sintasa autoinductora (LasI, RhII), en donde LasI dirige la síntesis del N- (3-oxododecanoil) -1-homoserina lactona (3OC12-HSL), mientras que RhII dirige la síntesis de N- (butiril) -1-homoserina lactona (C4-HSL). (Kruczeky y col., 2014). Los

sistemas LasI/LasR y RhII/RhIR son importantes en la virulencia de la bacteria ya que controlan la producción de numerosos factores de virulencia. (Kruczeky y col., 2014).

*P. aeruginosa* tiene muchos factores de virulencia como lo son:

**Adhesinas:** La adherencia de *P. aeruginosa* está mediada por los *pilis* estos desempeñan una importancia función en la unión de células epiteliales, aumentando así su adherencia a las células (Murray y col., 2014).

**Cápsula:** Sustancia viscosa que forma una cubierta o envoltura alrededor de la bacteria, le da protección al microorganismo de la fagocitosis y de antibióticos como también la capa polisacárida de la cápsula ayuda a las bacterias a adherirse a las células epiteliales (Pelczar y col., 1972).

**Piocianina:** Pigmento azul que genera daños tisulares e incrementa la quimiotaxis de neutrófilos (Murray y col., 2014).

**Flagelos:** Son apéndices capilares que salen de la pared celular y que se originan en una estructura granular por debajo de la membrana celular, estos le confieren movilidad a la bacteria (Pelczar y col., 1972).

**Exotoxina A:** De los factores de virulencia más importantes producidos por las cepas patógenas de *P. aeruginosa* está la exotoxina A, una toxina (sustancia venenosa que puede ser de origen microbiano) que altera la síntesis de proteínas, produciendo daño tisular del huésped (Murray y col., 2014).

**Elastasa:** Enzima que ocasiona la destrucción de los tejidos que contienen elastina (p. ej., vasos sanguíneos, tejido pulmonar, piel), colágeno, inmunoglobulinas y factores del complemento (Murray y col., 2014).

**Proteasa:** Una enzima que produce la destrucción tisular dado a la ruptura de los enlaces peptídicos de las proteínas, además de generar la inactivación del interferón y del factor de necrosis tumoral (Pelczar y col., 1972).

Dado a los múltiples factores de virulencia con que cuenta *P. aeruginosa*, esta bacteria puede causar enfermedades como neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias, así como una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística, debido a las infecciones crónicas que eventualmente conducen a un daño a nivel pulmonar e insuficiencia respiratoria (Ochoa y col., 2013). Estas características hacen que las infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* sean difíciles de erradicar debido a su elevada resistencia intrínseca, además de su capacidad para adquirir resistencia a diversos antibióticos (Ochoa y col., 2013)

## Plásmidos

Los plásmidos son elementos extra cromosómicos móviles presentes en la mayoría de las bacterias, algunas de estas moléculas de DNA poseen la habilidad de transferirse a otras bacterias a las cuales les confiere propiedades que complementan su capacidad para colonizar ambientes adversos (Ramírez-Díaz y col., 2011). A menudo los plásmidos contienen genes que codifican mecanismos que les permite a las bacterias sobrevivir en condiciones críticas adversas (Ramírez-Díaz y col., 2011). Los plásmidos favorecen el intercambio de material genético intracelular y garantizan la diseminación horizontal de

genes de resistencia a antibióticos y de otras funciones entre géneros bacterianos distintos (Narvaez y col., 2005). Los plásmidos son una herramienta fundamental en Biología Molecular e Ingeniería Genética ya que se pueden usar como “vectores” para introducir en ellos cualquier fragmento de ADN de interés y de esta forma amplificarlo de forma natural dentro de la bacteria en la que el plásmido se replica (es lo que se llama “clonar” un fragmento de DNA) (Repullo y col., 2020).

Los plásmidos son con mayor frecuencia moléculas circulares de ADN de doble cadena que tienen la capacidad de replicarse de forma autónoma y varían ampliamente en tamaño, el cual va desde miles a cientos de miles de pares de bases (un tamaño comparable al cromosoma bacteriano) (Loeza-Lara y col., 2004). Dependiendo de su tamaño pueden codificar desde unas cuantas proteínas hasta cientos de ellas (Loeza-Lara y col., 2004). Cada plásmido tiene por lo menos una secuencia de ADN que sirve como origen de replicación, es decir, un punto de partida para la replicación de la molécula de ADN, que permite al plásmido replicarse independientemente del ADN del cromosoma (Cejudo y col., 2010). El número de plásmidos presentes en una célula puede variar, dependiendo del tipo de plásmido, pudiendo estar presente desde una copia a cientos por célula (Cejudo y col., 2010). Algunas clases de plásmidos poseen además la propiedad conocida como “replicación relajada”, esto es que están presentes en forma de muchas copias por célula lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación (Cejudo y col., 2010). Los productos de sus genes generalmente dan a las bacterias una ventaja selectiva bajo ciertas condiciones de crecimiento (Loeza-Lara y col., 2004). Por ejemplo, algunos plásmidos son capaces de conferir resistencia a antibióticos como la ampicilina, tetraciclina y kanamicina (Loeza-Lara y col., 2004). Para poder replicarse de

forma independiente los plásmidos existen de forma independiente del cromosoma. A los que tienen esta capacidad se les denomina replicones (Lewin, 2008), mientras que los plásmidos que no poseen esta capacidad y que se integran de forma reversible al cromosoma bacteriano para replicarse bajo su control se les denomina episomas (Lewin, 2008). Debido al gran número de plásmidos identificados en la naturaleza, estos se clasifican de acuerdo con el tipo de genes que contiene: 1) los plásmidos pueden ser de resistencia, y que son aquellos que le permiten a la bacteria combatir a un veneno, un antibiótico o metales pesados (Hernández-Ramírez, 2019). 2) También existen plásmidos denominados degradativos ya que codifican a proteínas que ayudan a la célula a digerir sustancias de su entorno (Hernández-Ramírez, 2019). 3) Existen plásmidos de virulencia que codifican a toxinas que incrementa la virulencia de las bacterias que los contienen (Hernández-Ramírez, 2019). Los plásmidos de virulencia son los causantes de que una bacteria tenga mayor capacidad para causar una enfermedad como lo es el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* (Hernández-Ramírez, 2019).

### Plásmido pUM505

El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* obtenida de un paciente con otitis media (Fig. 1). El plásmido pUM505 es un replicón que contiene 138 regiones codificantes que posee dos regiones bien definidas, la primera consiste en una isla genómica (IG) de 31 kilobases (kb) en la cual contiene genes que participan en la resistencia de cromato y mercurio y la segunda región de 67 kilobases que corresponde a una isla genómica de patogenicidad (PAI) (Ramírez-Díaz y col., 2011). La PAI de pUM505 además de contener genes de replicación de DNA contiene genes involucrados en la virulencia (Ramírez-Díaz y col., 2011; Rodríguez-Andrade y col., 2015). El plásmido

pUM505 es considerado un plásmido de virulencia, ya que se determinó que, al ser transferido, pUM505 es capaz de incrementar la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 2) (Rodríguez-Andrade y col., 2015). Aunado a esto, la generación de una biblioteca de genes del plásmido pUM505 y su posterior transferencia a la cepa de *Escherichia coli*, permitió identificar que el plásmido pUM505 posee genes (como los *orfs* 2, 17, 26, 94 y 111) que participan en el aumento de la virulencia de *P. aeruginosa* y de *E. coli*. (Rodríguez-Andrade y col., 2015). La virulencia conferida por estos genes es regulada por el sistema de Quorum-sensing, un sistema que percibe la densidad de población celular y regula la expresión de genes que codifican a factores de virulencia (Rodríguez-Andrade y col., 2015).

### Generalidades de virulencia

La virulencia es un término cuantitativo que define el grado en que un patógeno puede causar enfermedad; esto a menudo está relacionado con el número de microorganismos que se requieren para causar la infección o la frecuencia de infección en una población dada y los determinantes de virulencia de la cepa (Perea, 1992).

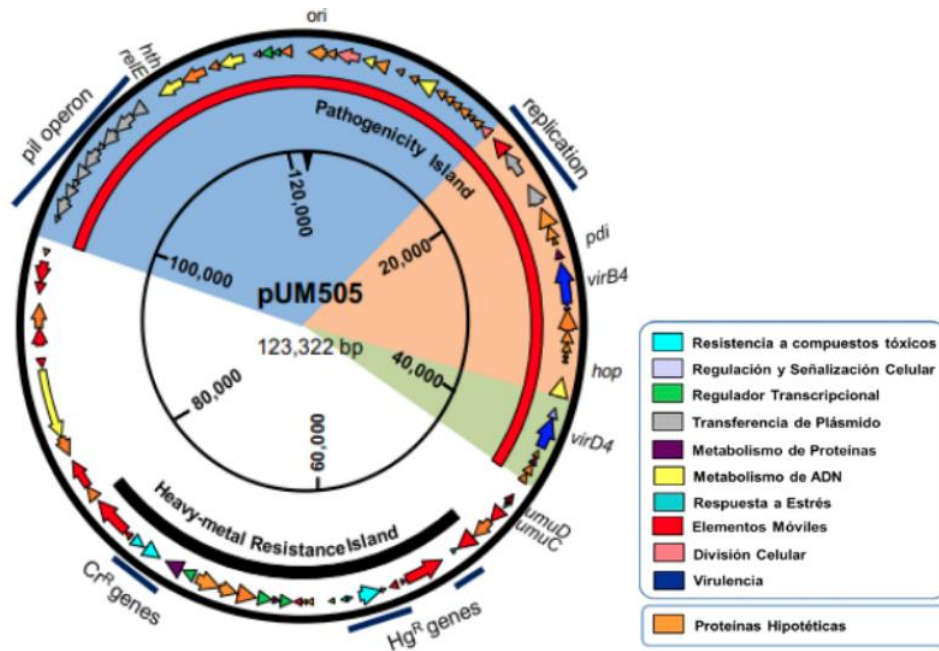
Los factores de virulencia son las habilidades con las cuales los microorganismos patógenos infectan a un huésped, lo que les permite generar la invasión, infección, modulación de la respuesta inmune a su favor y dificultad en el tratamiento contra ellos (Cardona y col., 2012). Aunado a los factores de virulencia, algunas características del hospedero, como la humedad en ciertas áreas del cuerpo, la inmunosupresión y la presencia de artefactos médicos invasivos influyen en la capacidad de virulencia que presenta el patógeno (Cardona y col., 2012). Son múltiples los factores que pueden mediar en la relación entre virulencia y resistencia, y a menudo genes implicados en

ambos fenómenos presentan el mismo medio de transporte y dispersión, como los plásmidos, las islas, integrones, transposones y otros elementos genéticos podrían también facilitar la co-selección de genes implicados en virulencia y resistencia (Beceiro y col., 2012)

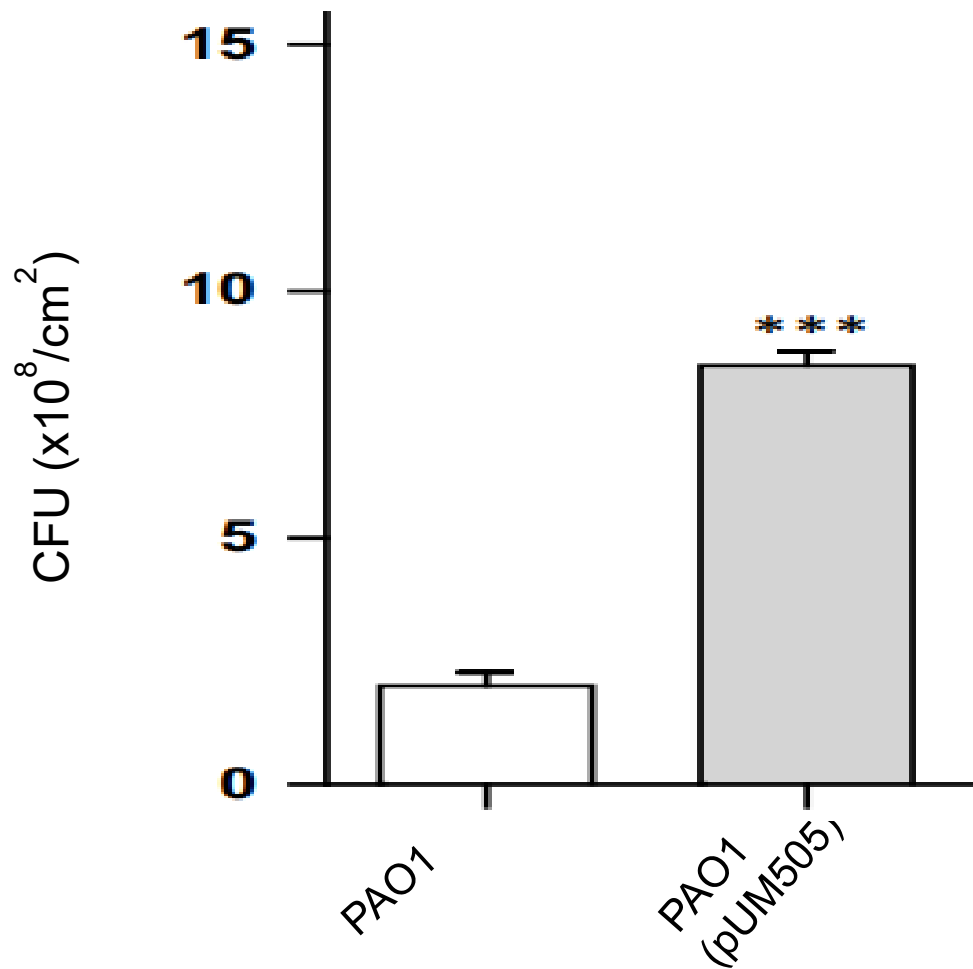
Las infecciones son procesos que conllevan varias etapas y los factores de virulencia pueden clasificarse en 3 tipos:

- a) Factores que promueven la colonización e invasión del huésped (Salyers, 1994)..
- b) Factores que contribuyen a evadir la acción inmunitaria del huésped (Salyers, 1994).
- c) Factores que causan daño al huésped, ya sea por toxicidad directa o indirecta induciendo una respuesta inflamatoria (Salyers, 1994)..

Mientras que los factores que participan en la colonización e invasión del huésped y la invasión de la acción inmunitaria del huésped son capaces de aumentar la probabilidad de infección, los factores que causan daño al huésped determinan la severidad de la infección (Salyers, 1994). *P. aeruginosa* tiene muchos factores de virulencia, entre los que se encuentran componentes estructurales, toxinas y enzimas; sin embargo, es difícil definir el papel que cada factor desempeña en la enfermedad, y la mayoría de los expertos en este campo cree que su virulencia es multifactorial (Murray y col., 2014).



**Figura 1. 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 con los diferentes colores mostrados en el cuadro de la derecha, indicando también las proteínas hipotéticas. 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<sup>R</sup>) y resistencia a cromato (Cr<sup>R</sup>). Los bloques de estructura de mosaico se representan como regiones de colores azul, naranja y verde. (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).



**Figura 2. Virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505 en un modelo de infección de hojas de lechuga. Se muestran las unidades formadoras de colonias (UFC) determinadas a partir de áreas de lesión de hojas de lechuga infectadas con las cepas bacterianas. Los datos son las medias de seis experimentos independientes con la desviación estándar (DE) mostrada. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (PAO1) están indicadas por \*\*\* P < 0.001 (Prueba de Tukey) (modificado de Rodríguez y col., 2015).**

## Composición de la sangre

La sangre es parte del tejido conjuntivo que tiene origen embriológico proveniente del mesénquima, tejido primitivo que está conformado por células indiferenciadas y pluripotentes (células que dependiendo de su código genético específico y del microambiente que las rodea pueden originar células de morfología y funcionalidad distintas) (Montalvo, 2019). La sangre es un tejido que se caracteriza por ser de consistencia líquida, color rojo brillante en el interior de las arterias y color rojo oscuro cuando circula por las venas (Montalvo, 2019). La sangre tiene tres funciones generales:

**1. Transporte:** la sangre transporta oxígeno desde los pulmones hacia las células del cuerpo y dióxido de carbono desde las células hacia los pulmones. También lleva nutrientes desde el tracto gastrointestinal hacia las células y hormonas desde las glándulas endocrinas hacia otras células. Y, por último, transporta calor y productos de desecho hacia diferentes órganos para que sean eliminados del cuerpo (Tortora y Derrickson, 2006).

**2. Regulación.** La sangre circulante ayuda a mantener la homeostasis de todos los líquidos corporales. Ayuda a regular el pH por medio de la utilización de sustancias amortiguadoras (buffers), sustancias que convierten en débiles los ácidos o las bases fuertes. Asimismo, la presión osmótica de la sangre influye en el contenido de agua de las células, principalmente por las interacciones entre los iones disueltos y las proteínas (Tortora y Derrickson, 2006).

**3. Protección.** La sangre tiene acción coagulante, lo cual previene su pérdida excesiva del sistema circulatorio tras una lesión. Los glóbulos blancos tienen la función de llevar a cabo la fagocitosis (Tortora y Derrickson, 2006).

#### Suero sanguíneo

Las células sanguíneas son de tres tipos: eritrocitos o glóbulos rojos, leucocitos o glóbulos blancos, centrados en el sistema inmune para la defensa contra las infecciones; y las plaquetas, que intervienen en el proceso de coagulación de la sangre (Heredia-Díaz y col., 2016). Cuando la sangre se extrae de los vasos sanguíneos permanece un tiempo corto en estado líquido, posteriormente se coagula y adquiere una consistencia gelatinosa densa; el volumen se retrae (coágulo) y se libera un líquido denominado suero sanguíneo (Montalvo, 2019) (Fig. 3). En cambio, si a la sangre recién extraída se le procesa para evitar la coagulación (adición de sustancias anticoagulantes como la heparina, citrato de sodio o de potasio, ácido etildiaminotetracético o EDTA) y se le deja en reposo entonces las células sedimentan y en la parte superior queda un líquido denominado plasma (Montalvo, 2019). El plasma sanguíneo está compuesto por un 90% de agua y un 10% de solutos, de los cuales el 10% son sales iónicas, 20% moléculas orgánicas pequeñas y el 70% proteínas (Heredia-Díaz y col., 2016).

El suero desnaturalizado es el suero sanguíneo obtenido llevado a un proceso de calentamiento para así lograr la desnaturalización de las proteínas del suero (Montalvo, 2019).

#### Efecto del suero sanguíneo en la virulencia de microorganismos

Se ha descrito que el suero sanguíneo, un componente de la sangre, es capaz de modificar la capacidad de virulencia de los microorganismos (Oogai y col., 2011).

Se ha reportado que las esporas del hongo *Mucor circinelloides* producidas en medio YPG suplementado con suero sanguíneo muestran mayor virulencia que esporas crecidas sin la adición de suero sanguíneo (Patiño-Medina y col., 2019). Mientras que, en *Staphylococcus aureus* la expresión de muchos factores de virulencia como hemolisinas, enterotoxinas, proteasas y factores para la adquisición del hierro se incrementa en presencia de suero (Oogai y col., 2011).



suero = plasma menos fibrinógeno y factores de coagulación

**Figura 3. Suero sanguíneo y sangre coagulada.** Se observan las fases de la separación del suero y los elementos de coagulación (obtenida de Tortora y Derrickson, 2006).

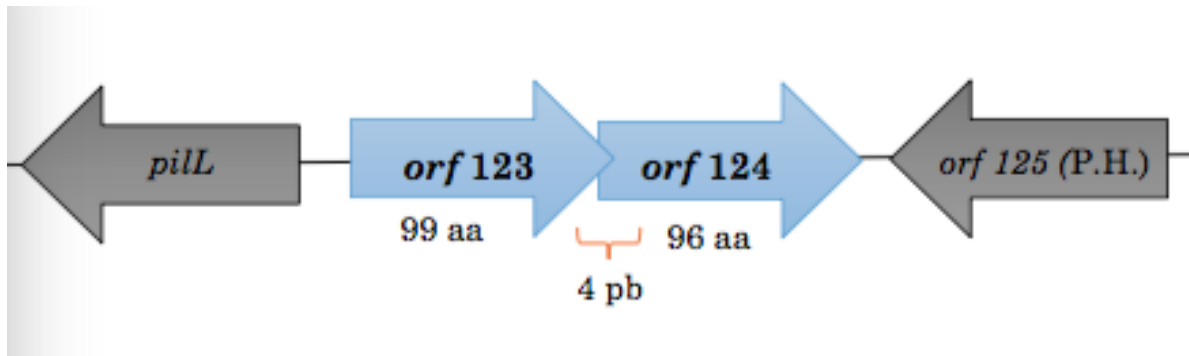
## ANTECEDENTES

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo que tiene una amplia distribución en el suelo y agua, a veces coloniza al ser humano y es el principal microorganismo patógeno humano, produce infecciones en pacientes inmunocomprometidos y es un microorganismo patógeno importante en los hospitales ya que tiene en primer lugar en infecciones intrahospitalarias (Brooks, 2008).

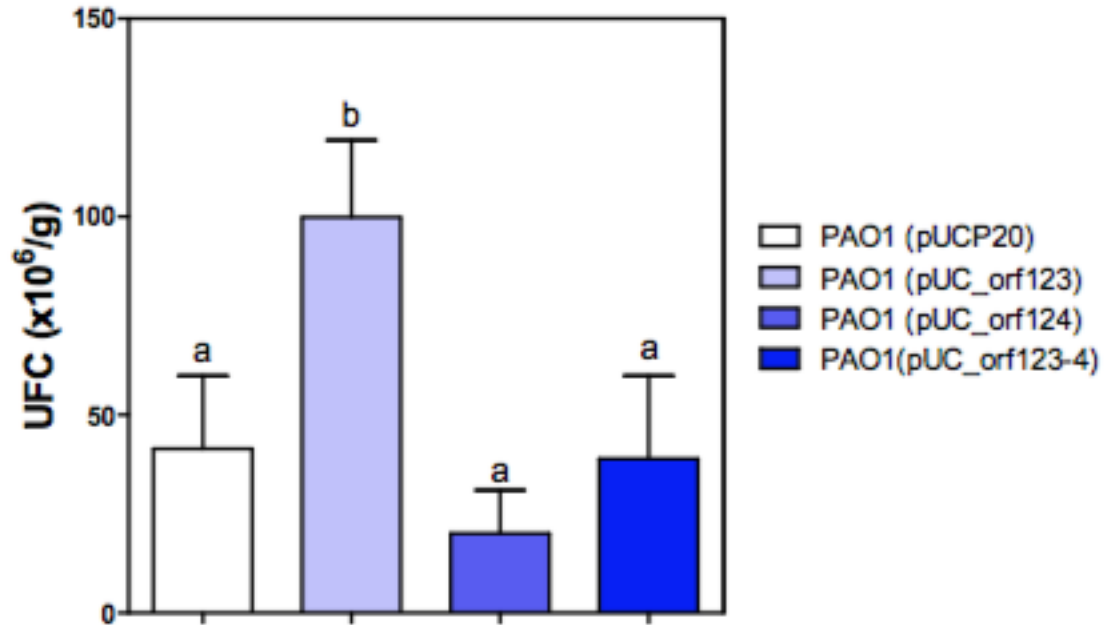
El plásmido pUM505 (fig. 1) es un elemento genético móvil que se aisló de una cepa clínica de *P. aeruginosa*, contiene 138 regiones codificantes, y es capaz de auto transferirse a otras cepas de la misma especie y conferir virulencia (Ramírez-Díaz y col., 2011). Presenta dos regiones bien definidas: una isla genómica de resistencia a metales como cromato y mercurio inorgánico, y una isla de patogenicidad en la que se encuentran segmentos de DNA que incluyen elementos móviles y genes de virulencia (Ramírez-Díaz y col., 2011). Adicionalmente, pUM505 contiene genes involucrados en la reparación de daños al DNA, tolerancia a estrés oxidativo, resistencia a quinolonas y un sistema toxina-antitoxina (Ramírez-Díaz y col., 2011; Rodríguez-Andrade y col., 2015; Hernández-Ramírez y col., 2018). La transferencia del plásmido pUM505 a *P. aeruginosa* incrementa la virulencia de la bacteria en ratón y en el nematodo *C. elegans*, indicando que el plásmido es importante para la adaptación y la virulencia de las bacterias (Hernández-Ramírez y col., 2018). Este plásmido también contiene un operón (genes *pumA* y *pumB*) (Fig. 4) que codifica al sistema Toxina-Antitoxina PumAB que incrementa la estabilidad de plásmidos (Hernández-Ramírez y col., 2018). La proteína PumA que es codificada por el gen *pumA* del sistema toxina-antitoxina del plásmido pUM505, incrementa la virulencia de *P. aeruginosa* en modelo vegetal y animal (Fig. 5)

(Hernández-Ramírez y col., 2018). Aunado a esto, la toxina PumA es capaz de incrementar la invasibilidad de *P. aeruginosa* en los tejidos de ratón, fortaleciendo la participación de PumA en la virulencia de la bacteria (Hernández-Ramírez y col., 2018). El efecto de la toxina es neutralizado por la antitoxina PumB que es codificada por el gen *pumB* (Fig. 4 y 5) (Hernández-Ramírez y col., 2018). Lo que ha sugerido que la toxina PumA codificada por el plásmido pUM505 podría actuar como un factor de virulencia en bacterias. (Hernández-Ramírez y col., 2018).

El gen *pumA* fue transferido a la cepa de *P. aeruginosa* lasI/rhII, una cepa mutante en los sistemas LasI y RhII del QS, para analizar el efecto del QS en la virulencia conferida por el sistema Toxina-Antitoxina PumAB (Hernández-Ramírez y col., 2020). La transferencia de *pumA* no aumentó la virulencia bacteriana en lechuga y en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, sugiriendo que la virulencia conferida por la toxina PumA requiere modulación QS (Hernández-Ramírez y col., 2020). Aunado a esto, los niveles de ARNm del gen *pumA* disminuyeron drásticamente en la cepa *P. aeruginosa* lasI/rhII (pUC\_*pumA*), lo que sugirió una regulación positiva de la expresión del gen *pumA* por el sistema de QS (Hernández-Ramírez y col., 2020). La suplementación del medio de crecimiento de *P. aeruginosa* lasI/rhII (pUC\_*pumA*) con las moléculas autoinductoras de QS de *P. aeruginosa* como las acil homoserina lactonas C4-AHL y 3-oxo-C12-AHL generó un aumento de los niveles del ARNm de *pumA* y restableció la virulencia bacteriana, lo que indicó que ambos autoinductores complementaron las mutaciones del QS y regularon positivamente los efectos tóxicos de la toxina PumA (Hernández-Ramírez y col., 2020). Esto indicó que el sistema de QS regula la virulencia bacteriana conferida por la toxina PumA (Hernández-Ramírez y col., 2020).



**Figura 4. Arreglo genético del operón *pumAB* del plásmido pUM505.** Las flechas en azul representan los genes *pumA* (antes nombrado *orf123*) y el gen *pumB* (antes descrito como *orf124*), los cuales se encuentran traslapados por 4 pares de bases (pb). En la parte inferior se indica el tamaño en aminoácidos (aa) de las proteínas codificadas por los genes *pumA* y *pumB*. Con flechas en gris se representan los genes que flanquean al operón *pumAB*, en donde el *orf125* codifica a una proteína hipotética, mientras que el gen *pilL* codifica a una proteína tipo PilL con identidad a proteínas que forman parte del *pil* bacteriano. (Obtenida de Hernández-Ramírez, 2015).



**Figura 5. Invasividad de *P. aeruginosa* en presencia y ausencia de los genes *pumA* y *pumB* en el pulmón del ratón.** Se inocularon ratones macho BALB/C de aproximadamente 8 semanas de edad por vía intravenosa con las diferentes cepas, después de 48 h se extrajo el pulmón y se determinó las UFC obtenidas. Se graficaron barras en diferentes colores dependiendo la cepa utilizada. (Obtenida de Hernández-Ramírez, 2015).

## JUSTIFICACIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria patógeno oportunista que es fuente de infecciones en humanos. El plásmido pUM505 es un elemento genético móvil que contiene una isla de patogenicidad con genes relacionados con virulencia, el cual al ser transferido a *P. aeruginosa* PAO1 es capaz de incrementar la virulencia de la bacteria. El suero sanguíneo modifica la expresión de genes que codifican a factores de virulencia en bacterias e incrementa la virulencia del hongo *M. circinelloides*. Por lo que es de interés evaluar el efecto del suero sanguíneo en la virulencia conferida por el plásmido pUM505, así como por los genes del operón *pumAB*.

## HIPOTESIS

El suero sanguíneo regula la virulencia conferida por el plásmido pUM505 y por el operón *pumAB* en *P. aeruginosa*.

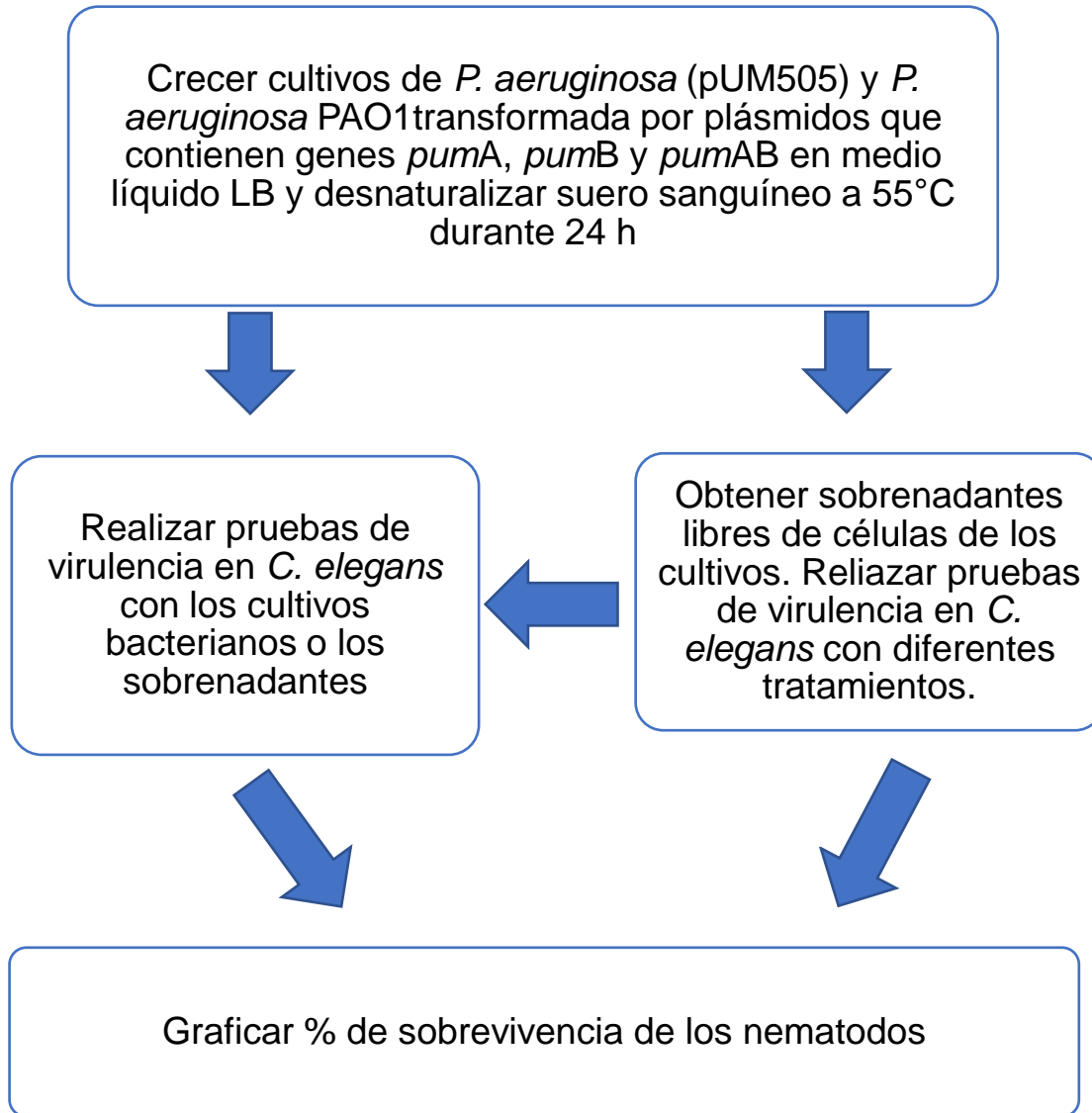
## OBJETIVO GENERAL

Determinar si la presencia de suero modula la virulencia conferida por el plásmido pUM505 y por la toxina PumA en *P. aeruginosa*.

## OBJETIVO ESPECÍFICO

- Evaluar el efecto del suero sanguíneo en la virulencia conferida por el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*.
- Evaluar el efecto del suero sanguíneo en la virulencia conferida por la toxina PumA del plásmido pUM505.
- Determinar el efecto de la adición de suero sanguíneo en la función de la regulación de la antitoxina PumB del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y METODOS

### Medios de cultivo

- a) Medio M9: sales minerales M9 (Sigma), glucosa 20 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 mM y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2 mM (Sambrook y col., 1989).
- b) Medio Luria Bertani (LB): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%.
- c) Medio NGM: Para el litro de agua destilada adicionar 2 g de NaCl, 4 g de peptona de caseína, 3 g de fosfato monobásico, 0.5 g de fosfato de potasio dibásico y 20 g de agar. Antes de pasar a placa se le adiciona 1000  $\mu\text{L}$  de colesterol.

### Cepas

- a) *P. aeruginosa* PAO1 (Colección de la Dra. Iglewski's) (Iglewski y col., 2007) esta cepa no contiene plásmidos es sensible a rifampicina y estreptomicina se empleó como cepa control en cuestión a la virulencia conferida por el plásmido pUM505.
- b) *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) esta cepa contiene el plásmido pUM505 lo que la hace más virulenta a la cepa PAO1.
- c) *E. coli* JM101, cepa utilizada para el crecimiento de los nematodos.
- d) *P. aeruginosa* pumA, cepa de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido pUC-pumA, que contiene el gen *pumA* clonado en el vector pUCP20 (Hernández-Ramírez y col., 2017).
- e) *P. aeruginosa* pumB, cepa de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido pUC-pumB, que contiene el gen *pumB* clonado en el vector pUCP20 (Hernández-Ramírez y col., 2017).
- f) *P. aeruginosa* pumAB, cepa de *P. aeruginosa* PAO1 transformada con el plásmido pUC-pumAB, que contiene el el operón *pumAB* clonado en el vector pUCP20 (Hernández-Ramírez y col., 2017).

## Sueros

- El suero empleado fue obtenido de hombres sanos de entre 20 y 30 años de edad.
- Suero Nativo: suero sanguíneo.
- Suero desnaturalizado 24H: suero sanguíneo sometido a un calentamiento de 55°C para desnaturalizar por 24 horas.
- Suero desnaturalizado 12H: suero sanguíneo sometido a un calentamiento de 55°C para desnaturalizar por 12 horas.
- Suero desnaturalizado 2H: suero sanguíneo sometido a un calentamiento de 55°C para desnaturalizar por 2 horas.

## Cultivos celulares y obtención de extractos libre de células

Los cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* fueron crecidos a 37°C, durante la noche en medio M9 en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo o desnaturalizado, posteriormente los cultivos fueron centrifugados y las pastillas celulares se re suspendieron en medio M9 fresco. Para la obtención de los sobrenadantes, cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* fueron crecidos durante la noche a 37°C en medio M9 y posteriormente centrifugados por 5 minutos a 12,000 rpm. Una vez centrifugado se recuperó el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga nuevo.

## Virulencia en el modelo de nematodo *Caenorhabditis elegans*

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés, en medio M9 a 37°C toda la noche. Adicionalmente, se crecieron durante 5-6 días nematodos *C. elegans* Bristol N2, hasta alcanzar la edad adulta, en una placa con medio NGM (medio de crecimiento de nematodos) a 18°C. En una placa de 96 pozos, se colocó 1.5 µL de las cepas de interés

y se llevó a un volumen final de 200  $\mu$ L con medio M9, en esterilidad se adicionó 18-20 nematodos por pocillo, posteriormente se cuantificó a los nematodos vivos dando un ligero toque con un asa estéril y se incubo a 18°C durante 3 días, monitoreando la sobrevivencia de los nematodos cada 6 h, 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 nematodos. Para los ensayos con los sobrenadantes de los cultivos bacterianos, los nematodos fueron incubados con 100  $\mu$ l del sobrenadante bacteriano re suspendido previamente en medio M9 en un volumen total de 1 ml, posteriormente las placas de los nematodos más el sobrenadante fueron incubados a 18°C determinando el % de nematodos vivos a las 6, 12, 24 y 36 horas. Los ensayos fueron realizados con una N de 2 por duplicado.

## RESULTADOS

### Efecto del suero nativo y el suero desnaturalizado en el crecimiento de PAO1 pUM505

Con el propósito de establecer si la adición de suero sanguíneo en el medio de cultivo afecta el crecimiento de *P. aeruginosa* PAO1 pUM505, se determinó el crecimiento de la bacteria en ausencia o presencia de 10 o 20% de suero sanguíneo nativo o desnaturalizado en el medio de cultivo. Para lo cual los cultivos bacterianos fueron incubados de 18 a 20 horas a 37°C y posteriormente se evaluó el crecimiento por la determinación de la Densidad óptica del cultivo a 600 nm. Los resultados mostraron que a excepción del cultivo de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 pUM505 sin tratamiento, la adición de suero sanguíneo nativo o desnaturalizado incrementaron el crecimiento de la bacteria, mostrando una densidad óptica que va en el rango de 1.812 a 2.583 (Tabla 1). Probablemente este incremento en el crecimiento se debe a que el suero proporciona nutrientes adicionales a los contenidos en el medio M9 (considerado como un medio de cultivo mínimo) a la bacteria para un mejor desarrollo.

**Tabla 1.** Crecimiento de *P. aeruginosa* pUM505 en medio de cultivo M9 en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de suero nativo o desnaturalizado

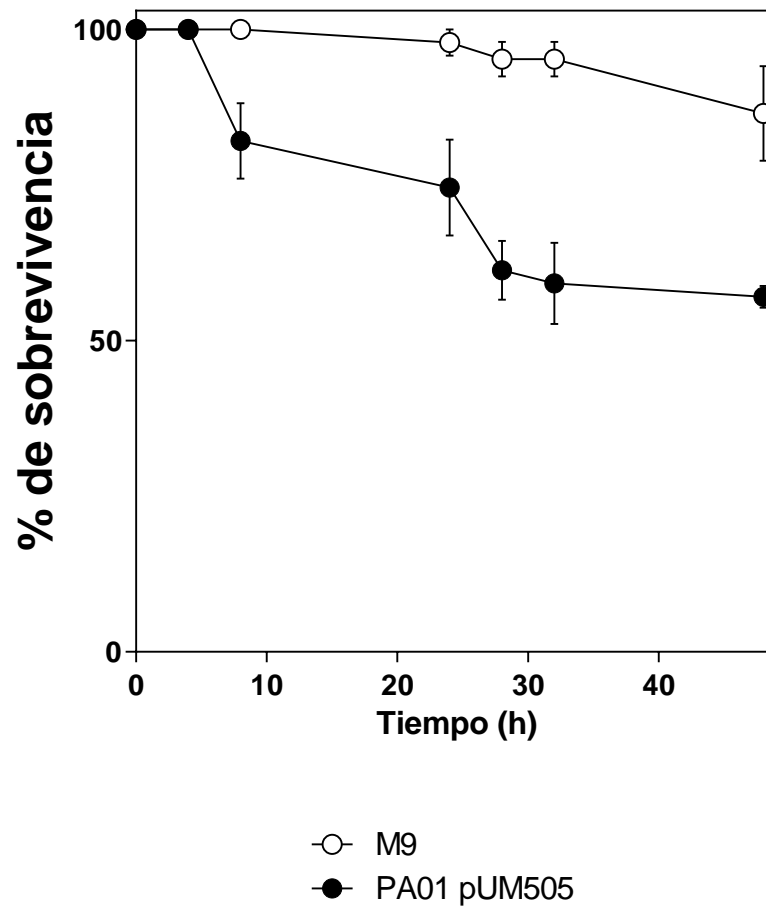
<b>Cepas:</b>	<b>Resultados:</b>
<b>PA01 pUM505</b>	1.224 ± 0.086
<b>PA01 pUM505 S.N 10%</b>	1.812 ± 0.123
<b>PA01 pUM505 S.N 20%</b>	2.106 ± 0.001
<b>PA01 pUM505 S.D 10% 24H</b>	2.021 ± 0.074
<b>PA01 pUM505 S.D 20% 24H</b>	2.583 ± 0.224
<b>PA01 pUM505 S.D 20% 12H</b>	1.868 ± 0.145
<b>PA01 pUM505 S.D 20% 2H</b>	2.156 ± 0.055

### Virulencia de *P. aeruginosa* pUM505

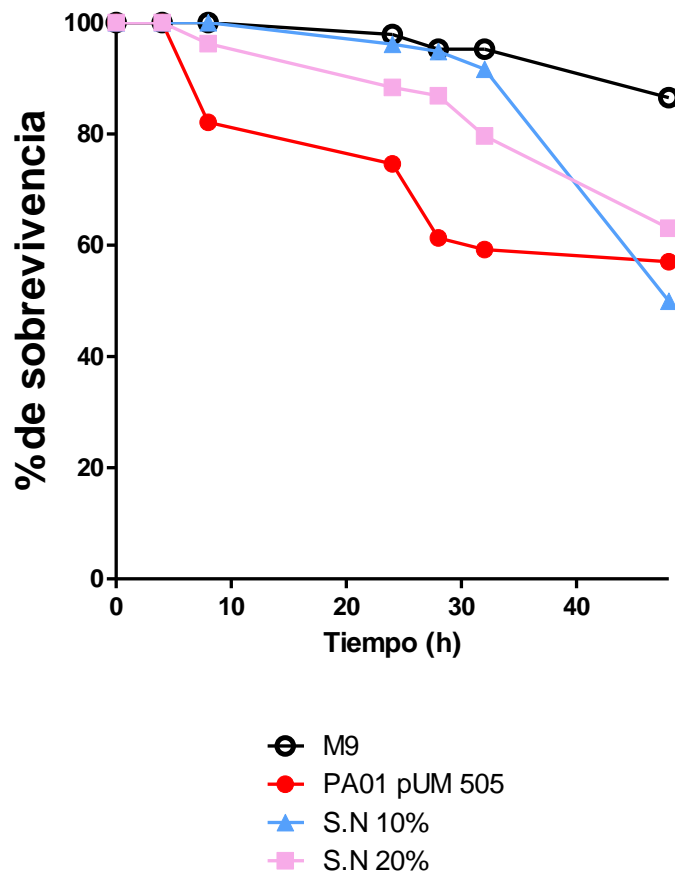
Primeramente, se llevó a cabo el análisis de la virulencia de la cepa de *P. aeruginosa* pUM505 en el nematodo *C. elegans*. Como se esperaba según los antecedentes de la participación del plásmido pUM505 en el aumento de la virulencia, los resultados mostraron una disminución de la sobrevivencia de los nematodos incubados en presencia de la cepa en comparación con el porcentaje de sobrevivencia de los nematodos incubados en presencia del medio M9 (Fig. 6).

### Efecto del suero sanguíneo nativo o desnaturalizado en la virulencia de *P. aeruginosa* pUM505

Con el propósito de evaluar el efecto del suero sanguíneo en la virulencia de *P. aeruginosa* pUM505, se realizaron ensayos de virulencia, utilizando como control negativo al medio M9. Los nematodos fueron incubados con cultivos de la cepa de *P. aeruginosa* pUM505 crecida previamente, fue incubada en presencia de suero nativo al 10% y 20%. Los resultados mostraron que la adición del suero sanguíneo nativo modifica de manera negativa la virulencia que confiere el plásmido pUM505, ya que se observó un aumento en la sobrevivencia de los nematodos (Fig. 7). El porcentaje de sobrevivencia de los nematodos incubados con los cultivos adicionados con el suero sanguíneo mostraron valores de sobrevivencia similares al control M9 en comparación con la incubación con el cultivo en ausencia de suero sanguíneo, el cual ocasionó la disminución de hasta 40% de la sobrevivencia de los nematodos a las 36 horas de ensayo.



**Figura 6. Virulencia de *P. aeruginosa* pUM505.** Grupos de 20 nematodos fueron incubados con  $1 \times 10^5$  ( $\pm 1 \times 10^4$ ) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* pUM505. Las mezclas de nematodo y cultivo fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de duplicados de 3 ensayos independientes.



**Figura 7. Virulencia de *P. aeruginosa* pUM505 en presencia de suero sanguíneo**

Grupos de 20 nematodos fueron incubados con  $1 \times 10^5$  ( $\pm 1 \times 10^4$ ) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* pUM505 previamente crecidas en ausencia o presencia de 10 o 20% de suero sanguíneo nativo (S.N). Las mezclas de nematodo y cultivo fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de duplicados de 3 ensayos independientes.

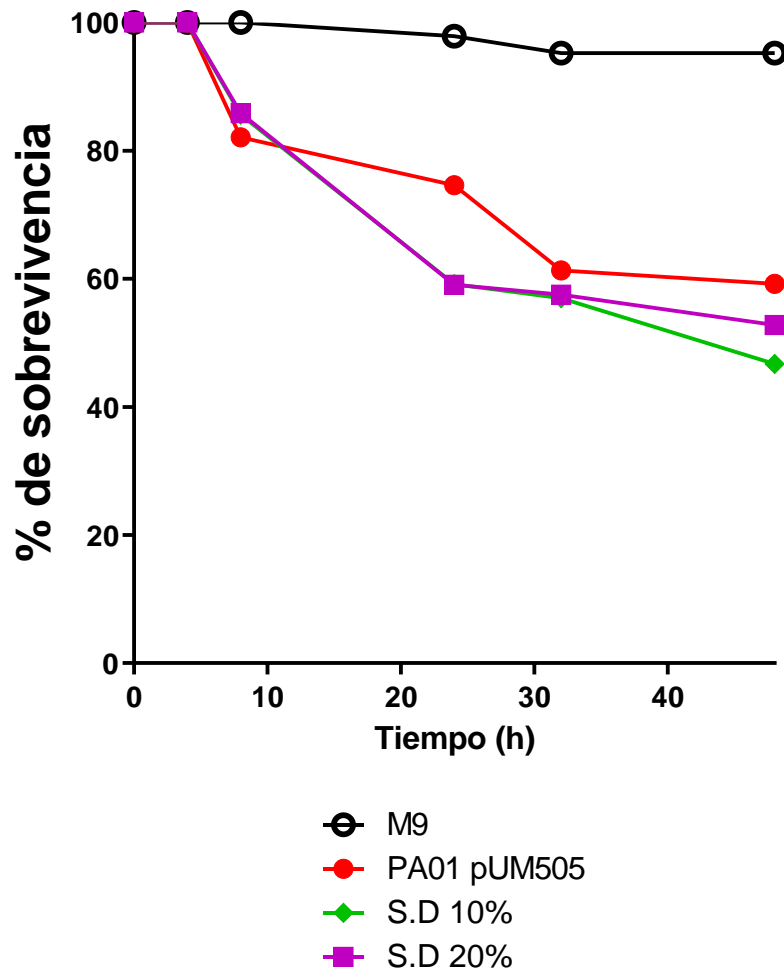
## Efecto de la desnaturalización del suero sanguíneo nativo en la virulencia de *P. aeruginosa* pUM505

Con el propósito de evaluar si alguno de los componentes del suero sanguíneo pudiera modificar el efecto observado por la adición del suero sanguíneo nativo en la virulencia conferida por el plásmido pUM505, se realizaron ensayos de virulencia empleando cultivos de la cepa previamente crecida con suero desnaturalizado. El suero sanguíneo nativo fue desnaturalizado previo a su uso por calentamiento durante 24 horas a 55°C. Los resultados mostraron que la adición de 10 o 20% de suero desnaturalizado al medio de cultivo no modifica de ninguna manera la virulencia que confiere el plásmido pUM505, ya que la incubación de los nematodos con los cultivos crecidos con o sin el suero desnaturalizado mostraron el mismo porcentaje de sobrevivencia (Fig. 8). Este resultado confirma que el suero sanguíneo nativo modifica negativamente la virulencia generada por el plásmido pUM505 y además sugiere que alguno de los componentes termolábiles del suero es quien regula este fenómeno.

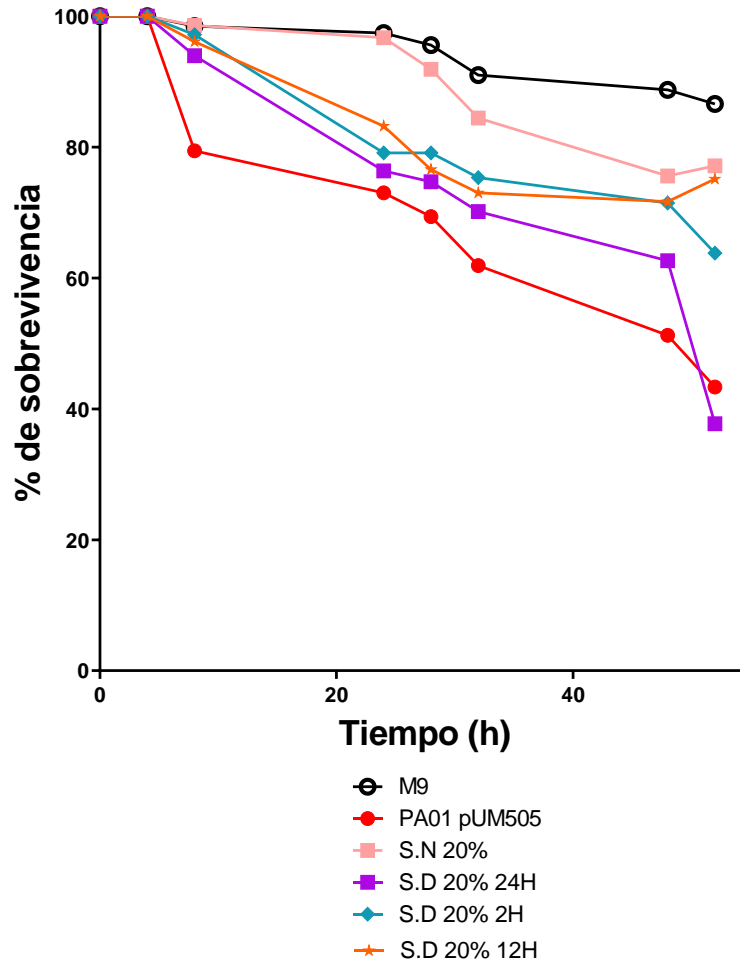
## Efecto del tiempo de desnaturalización del suero en la regulación de la de *P. aeruginosa* pUM505

Dado que se observó que la desnaturalización del suero nativo bloquea el efecto de la regulación que posee el suero sobre la virulencia conferida por el plásmido pUM505, se sugirió que algún componente termolábil del suero es quien modula el fenómeno de la virulencia, por lo que decidimos realizar la desnaturalización del suero sanguíneo nativo durante diferentes tiempos y evaluar su efecto en la virulencia de la bacteria. Los resultados mostraron que la desnaturalización del suero sanguíneo por 2 horas, tuvo un

efecto importante en la pérdida de capacidad de la regulación negativa de la virulencia conferida por el plásmido pUM505, si comparamos el porcentaje de sobrevivencia de los nematodos incubados con cultivos suplementados con suero desnaturalizado en esta condición en comparación con los cultivos bacterianos en presencia de suero nativo (Fig. 9). Aunado a esto, se observó que después de 36 horas de incubación los nematodos con los cultivos, el que procedía del medio suplementado con suero desnaturalizado por 24 horas mostro mayor virulencia, generando valores de sobrevivencia similares al cultivo proveniente de *P. aeruginosa* pUM505 sin adicción de suero. Estos ensayos sugieren que el calentamiento del suero conduce a la desnaturalización de un componente termolábil del suero, y confirmó que el suero nativo modula negativamente la virulencia conferida por pUM505.



**Figura 8. Virulencia de *P. aeruginosa* pUM505 en presencia de suero sanguíneo desnaturalizado.** Grupos de 20 nematodos fueron incubados con  $1 \times 10^5$  ( $\pm 1 \times 10^4$ ) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* pUM505 previamente crecidas en ausencia o presencia de 10 o 20% de suero sanguíneo desnaturalizado (S.D). Las mezclas de nematodo y cultivo fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de duplicados de 3 ensayos independientes.



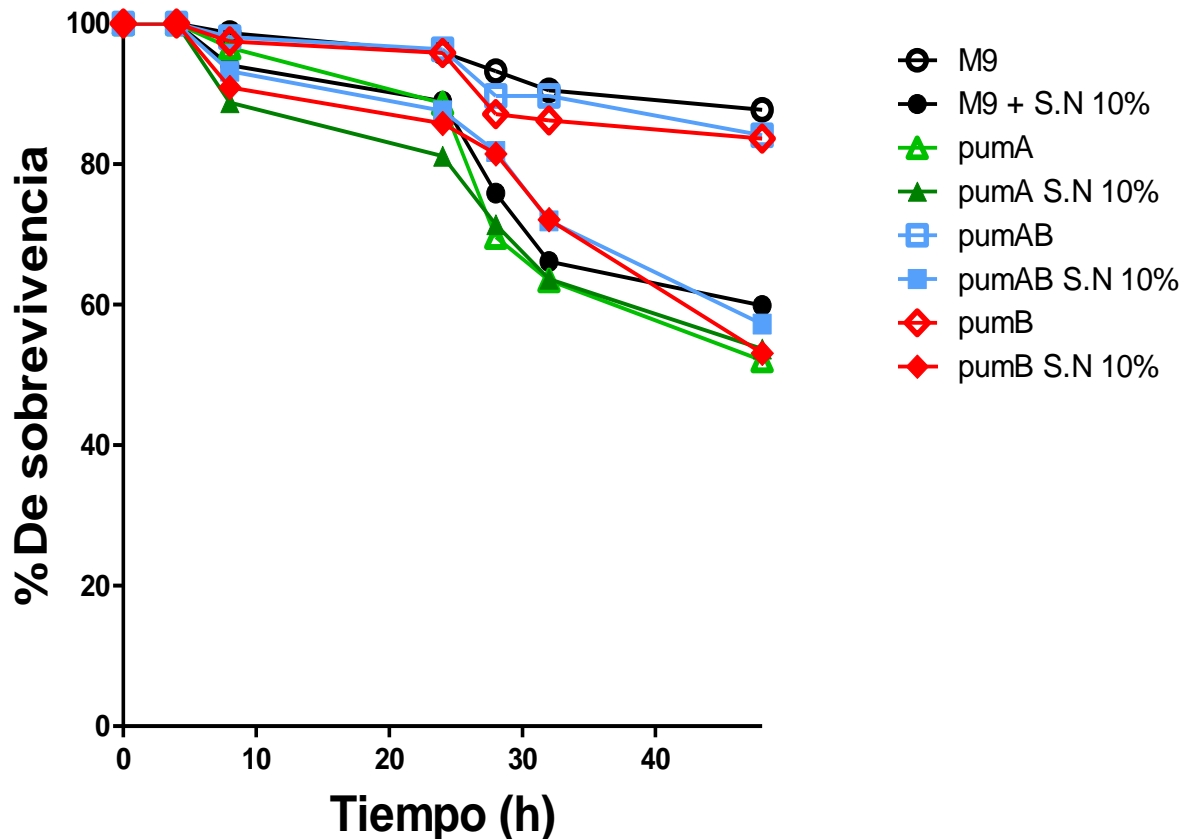
**Figura 9. Efecto del tiempo de desnaturalización del suero sanguíneo en la virulencia de *P. aeruginosa* pUM505.** Grupos de 20 nematodos fueron incubados con  $1 \times 10^5$  ( $\pm 1 \times 10^4$ ) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* pUM505 previamente crecidas en ausencia o presencia 20% de suero sanguíneo desnaturalizado (S.D) por diferente tiempo. Las mezclas de nematodo y cultivo fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de duplicados de 3 ensayos independientes.

## Ensayo de virulencia de PAO1 con la tóxina PumA, la antitoxina PumB y la toxina-antitoxina PumAB con suero nativo

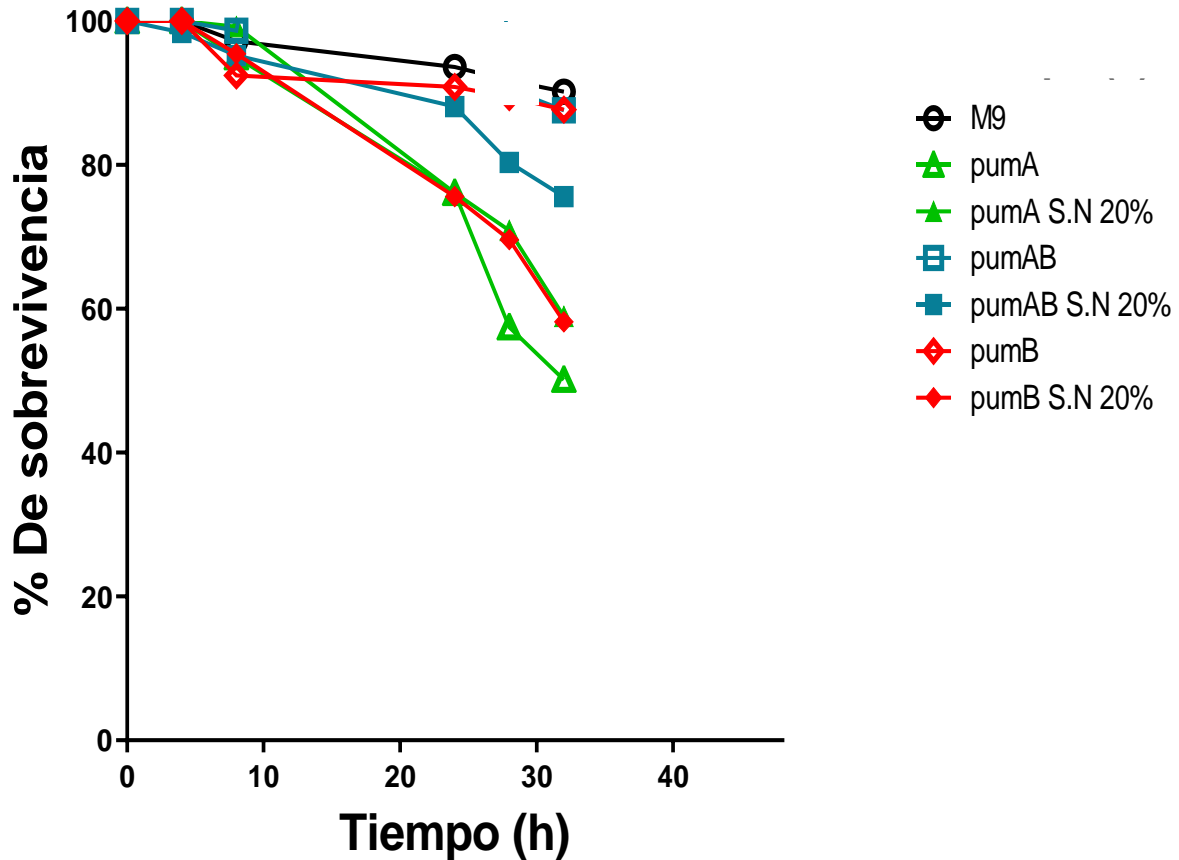
Dado que nuestros datos mostraron que la virulencia conferida por el plásmido pUM505 es regulada negativamente por la presencia de suero sanguíneo, procedimos a evaluar el efecto de este componente sobre la virulencia conferida por el sistema toxina-antitoxina PumAB, un sistema particular codificado en el plásmido pUM505. Para esto, se realizaron ensayos de virulencia empleando el modelo de *C. elegans*, empleado el medio M9 como control negativo del ensayo, así como transformantes de *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo plásmidos con los genes *pumA* y *pumB*, clonados de manera individual, y con el operón *pumAB* completo. Estas cepas son nombradas como PAO1 *pumA*, PAO1 *pumB* y PAO1 *pumAB*, respectivamente. Los resultados mostraron que, el suero nativo adicionado al 10% no modifica la virulencia que confiere la toxina PumA, ya que la sobrevivencia de los nematodos incubados con cultivos de la cepa PAO1 *pumA*, crecidos en presencia o ausencia del suero nativo fueron similares (Fig. 10). Este resultado fue contrastante con el efecto del suero sobre la virulencia conferida por el plásmido pUM505, en donde la adición de suero nativo al medio de cultivo generó la inhibición de la virulencia (Fig. 7). Además, se determinó que la adición de suero nativo al medio M9, generó la muerte de los nematodos a nivel similar al producido por la expresión de la toxina PumA (Fig. 11). De igual manera se observó que disminuyó significativamente la sobrevivencia de los nematodos incubados con cultivos de la cepa PAO1 *pumB* suplementado con suero nativo en comparación con la sobrevivencia de los nematodos incubados con POA1 *pumB* crecido sin suero, sugiriendo que el aumento en la virulencia podría ser debido a la presencia del suero nativo o bien que el suero regula

negativamente la función neutralizante de la antitoxina PumB (Fig. 10). De igual manera, la presencia de suero sanguíneo al 10% en el cultivo de PAO1 pumAB también condujo a un aumento de la virulencia de la cepa, reforzando la hipótesis de que el suero sanguíneo podría estar inhibiendo el efecto neutralizante que posee la antitoxina PumB sobre la toxina PumA.

Posteriormente se decidió realizar ensayos de virulencia aumentando la concentración del suero que se adicionó al medio de cultivo, esto con el propósito de determinar si al aumentar la concentración del suero se observaba un cambio en la virulencia conferida por la toxina PumA. Los resultados observados mostraron efectos similares a los obtenidos cuando se adiciono 10% de suero al medio de cultivo en donde el suero no modula la virulencia conferida por la toxina PumA pero si inhibe el papel neutralizador de la antitoxina PumB (Fig. 11). Estos datos confirman que el suero sanguíneo modula a los mecanismos de virulencia codificados por el plásmido pUM505.



**Figura 10. Efecto de la adición de 10% de suero sanguíneo en la virulencia de *P. aeruginosa* con los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505.** Grupos de 20 nematodos fueron incubados con  $1 \times 10^5$  ( $\pm 1 \times 10^4$ ) Unidades Formadoras de Colonias de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas en ausencia o presencia 10% de suero sanguíneo nativo (S.N). Las mezclas de nematodo y cultivo fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de duplicados de 3 ensayos independientes. Lo que confirma que el suero sanguíneo modula la virulencia de los mecanismos codificados por el plásmido pUM505.



**Figura 11. Efecto de la adición de 20% de suero sanguíneo en la virulencia de *P. aeruginosa* con los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505.** Grupos de 20 nematodos fueron incubados con  $1 \times 10^5$  ( $\pm 1 \times 10^4$ ) Unidades Formadoras de Colonias de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas en ausencia o presencia 20% de suero sanguíneo nativo (S.N). Las mezclas de nematodo y cultivo fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de duplicados de 6 ensayos independientes.

## Efecto del suero desnaturalizado en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 conteniendo los genes *pumA*, *pumB* o el operón *pumAB*

Se realizaron ensayos de virulencia de nematodos incubados de cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 *pumA*, PAO1 *pumB* o PAO1 *pumAB* crecidos en ausencia o presencia de suero desnaturalizado. Los resultados mostraron que la sobrevivencia de los nematodos incubados con los cultivos de las cepas de PAO1 *pumB* y PAO1 *pumAB* suplementados con 10% de suero desnaturalizado mostraron ser más virulentos que con respecto a los cultivos de estas cepas crecidos sin la adición de suero desnaturalizado (Fig. 12). Resultados que fueron similares a los obtenidos por la adición de suero nativo (Fig. 10 y 11). Sin embargo, la adición de suero desnaturalizado al medio de cultivo de la cepa PAO1 *pumA* si tuvo un efecto negativo, ya que ocasionó el aumento en la sobrevivencia de los nematodos (Fig. 12). Los ensayos de sobrevivencia también fueron realizados empleando la adición de 20% de suero desnaturalizado al medio de cultivo. Los resultados mostraron ser similares a los obtenidos a partir de cultivos suplementados con 10% de suero desnaturalizado, la sobrevivencia de los nematodos incubados con los cultivos de las cepas de PAO1 *pumB* y PAO1 *pumAB* suplementados con 10% de suero desnaturalizado fueron más virulentos en comparación a los cultivos sin la adición de suero desnaturalizado (Fig. 13), e igualmente el cultivo de la cepa PAO1 *pumA* suplementada con suero desnaturalizado fue menos virulenta en comparación con el cultivo de la cepa sin el suero desnaturalizado adicionado (Fig. 13). Estos resultados en conjunto sugieren que la desnaturalización del suero degrada un compuesto del suero que regula de manera positiva o permite el efecto toxico de la toxina PumA y por lo tanto al no estar presente conduce a una disminución en la capacidad de la virulencia de la

toxina PumA; pero, además, estos resultados indican que la molécula presente en el suero sanguíneo que inhibe la función de la antitoxina PumB es resistente al calentamiento.

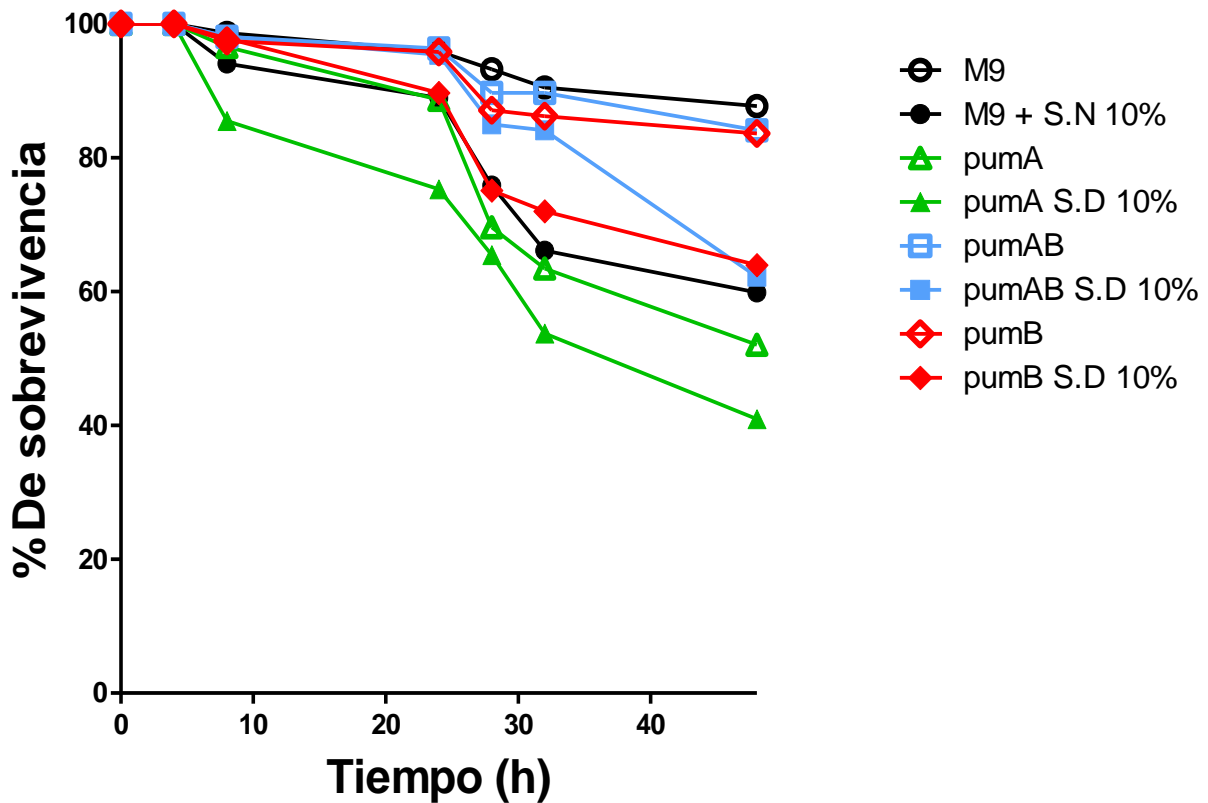
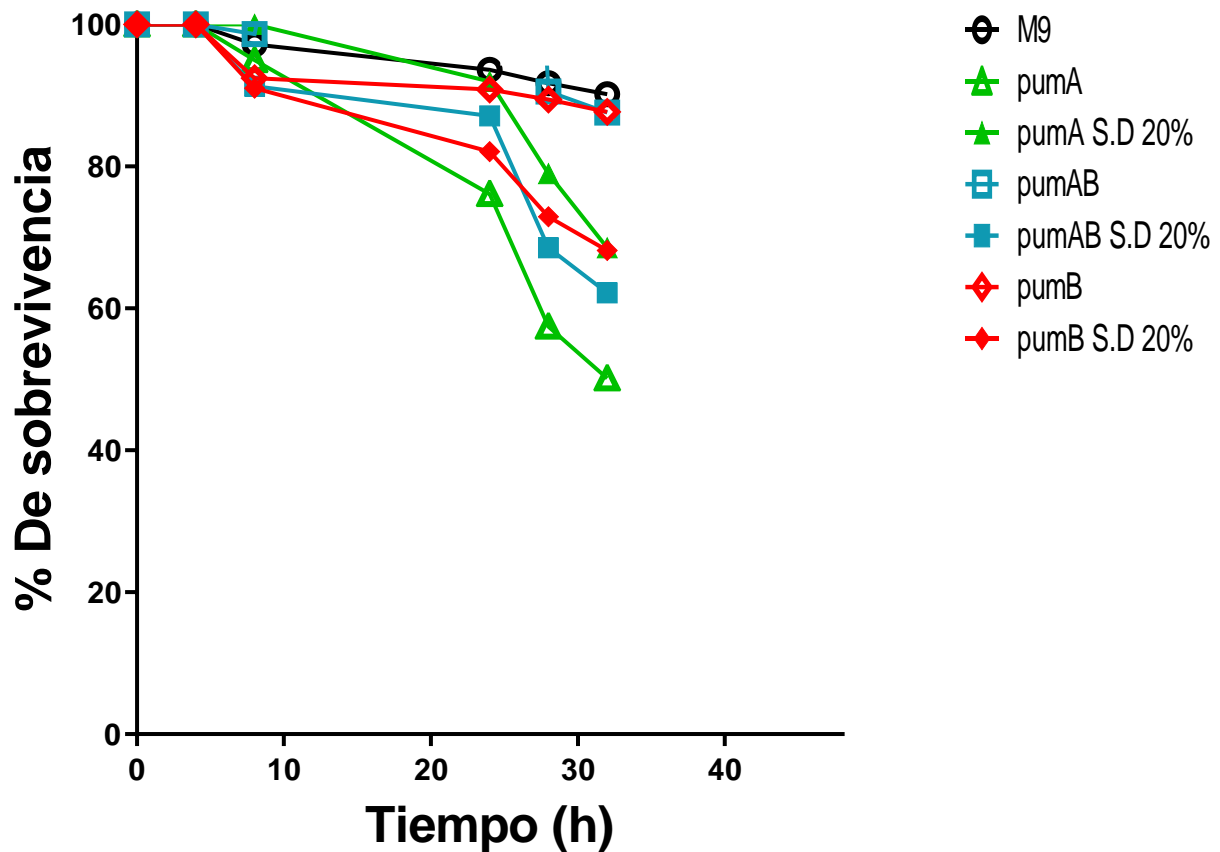


Figura 12. Efecto de la adición de 10% de suero sanguíneo desnaturalizado en la virulencia de *P. aeruginosa* con los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505. Grupos de 20 nematodos fueron incubados con  $1 \times 10^5$  ( $\pm 1 \times 10^4$ ) Unidades Formadoras de Colonias de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas en ausencia o presencia de 10% de suero sanguíneo desnaturalizado (S.D). Las mezclas de nematodo y cultivo fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de duplicados de 6 ensayos independientes.



**Figura 13. Efecto de la adición de 20% de suero sanguíneo desnaturalizado en la virulencia de *P. aeruginosa* con los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505.**

Grupos de 20 nematodos fueron incubados con  $1 \times 10^5$  ( $\pm 1 \times 10^4$ )

Unidades Formadoras de Colonias de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas

con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas en ausencia o

presencia de 20% de suero sanguíneo desnaturalizado (S.D). Las mezclas de

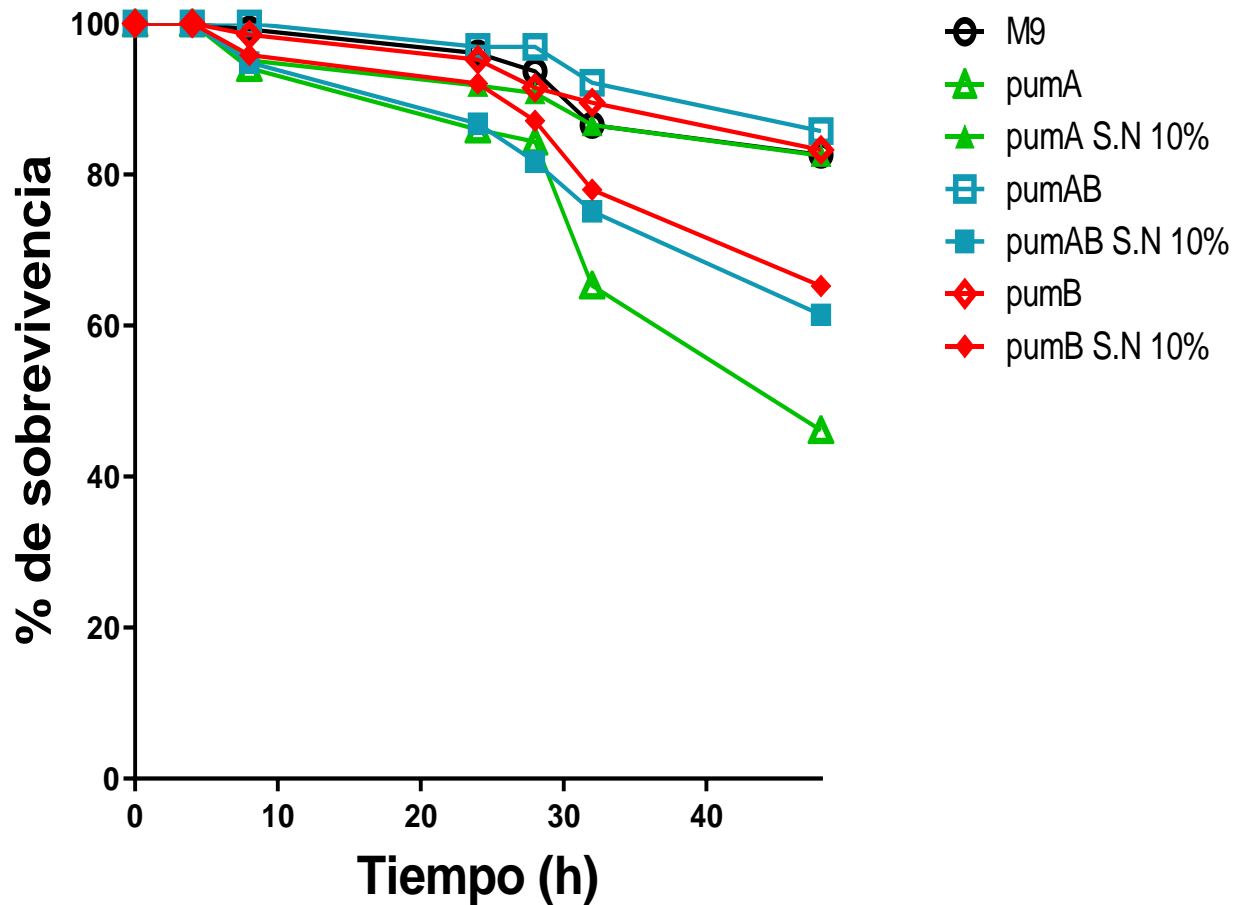
nematodo y cultivo fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el

número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de

duplicados de 6 ensayos independientes.

## Virulencia de sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *pumA*, *pumB* o *pumAB* de cultivos crecidos en presencia de suero nativo al 10%

Para determinar el efecto del sobrenadante en la virulencia, se pusieron a crecer cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 *pumA*, *P. aeruginosa* PAO1 *pumB* y *P. aeruginosa* PAO1 *pumAB* en ausencia de suero nativo (controles de virulencia) y en presencia de suero nativo, una vez crecidos los cultivos se obtuvo el sobrenadante libre de células, como se describe en materiales y métodos, el cual fue empleado para realizar los ensayos. Los resultados mostraron que el suero nativo modifica de manera negativa la virulencia que confiere el sobrenadante del cultivo donde se expresó la toxina PumA (Fig. 14), ya que se observó mayor sobrevivencia de los nematodos incubados con el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 *pumA*, a diferencia de los nematodos incubados con el sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa* PAO1 *pumB* donde se puede apreciar que el suero sí modifica el efecto de la antitoxina. Un efecto similar fue observado con el sobrenadante del *P. aeruginosa* PAO1 *pumAB*, ya que se observó la disminución en la sobrevivencia de *C. elegans*.



**Figura 14. Efecto del sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* crecidas en presencia de suero nativo en la sobrevivencia de *C. elegans*.** Grupos de 20 nematodos fueron incubados con el sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas en ausencia o presencia de 10% de suero nativo (SN). Las mezclas de nematodo y sobrenadante de los cultivos fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

## Ensayo de virulencia de PAO1 con el sobrenadante de la toxina PumA, la antitoxina PumB y la toxina-antitoxina PumAB con suero desnaturalizado al 10%

Con el propósito de determinar el efecto de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 pumA, *P. aeruginosa* PAO1 pumB y *P. aeruginosa* PAO1 pumAB crecidos en presencia o ausencia de suero desnaturalizado, se realizaron ensayos de virulencia. Los resultados mostraron que el suero nativo regula negativamente la virulencia del sobrenadante de *P. aeruginosa* pumA, ya que se observa un aumento en la sobrevivencia de los nematodos (Fig. 15). Sin embargo, el suero genera un incremento en la virulencia del sobrenadante de *P. aeruginosa* pumA, sugiriendo que alguno de los componentes del suero es requerido para la regulación de la virulencia conferida por la toxina PumA y para la regulación que ejerce PumB.

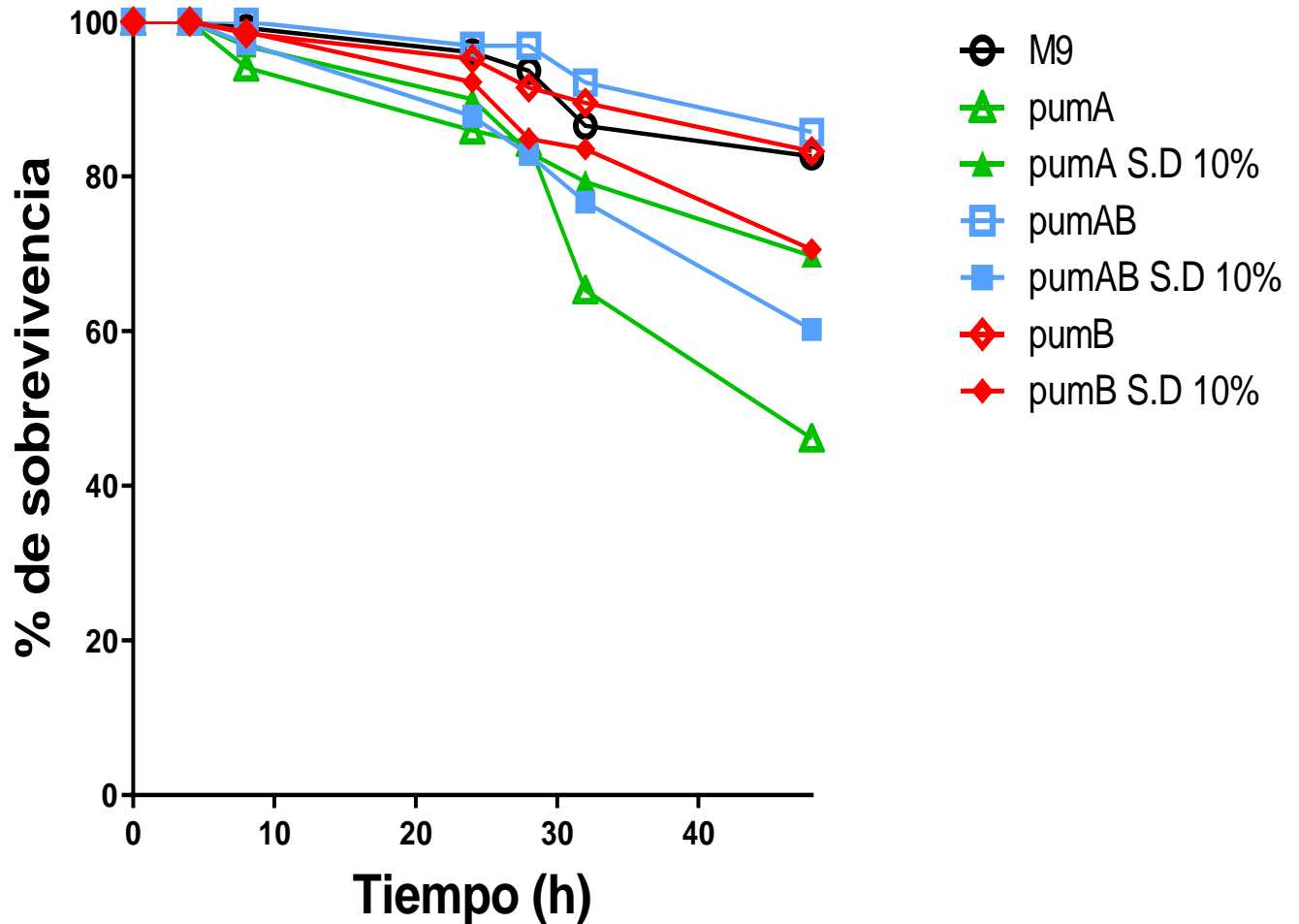


Figura 15. Efecto del sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* crecidas en presencia de suero desnaturalizado en la sobrevivencia de *C. elegans*. Grupos de 20 nematodos fueron incubados con el sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas en ausencia o presencia de 10% de suero desnaturalizado (SD). Las mezclas de nematodo y sobrenadante de los cultivos fueron incubadas a 18°C y posteriormente fue determinado el número de nematodos vivos a los tiempos indicados. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

## DISCUSIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria patógeno oportunista que se asocia principalmente con infecciones nosocomiales y la bacteriemia causada por esta, tiene un mal pronóstico con tasas de mortalidad muy altas. *P. aeruginosa* puede sobrevivir en muchos ambientes diferentes y coloniza plantas, animales y humanos (Pont y col., 2020). *P. aeruginosa* junto con otras especies bacterianas como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Klebsiella*, enterococos, estreptococos y estafilococos coagulasa negativo, pueden causar infecciones bacterianas del torrente sanguíneo, infecciones que en los países de ingresos altos es tan amplia como la de los accidentes cerebrovasculares, con un rango de 113 a 204 casos por cada 100,000 habitantes, las cuales tienen un mal pronóstico, con tasas de mortalidad de hasta el 40% (Kern y col., 2020). La capacidad de *P. aeruginosa* para sobrevivir en el cuerpo humano depende de un equilibrio entre sus numerosos factores de virulencia y la presencia de múltiples mecanismos de defensa del huésped. Independientemente del sitio primario de infección, esta puede cruzar las barreras epiteliales y endoteliales para llegar al torrente sanguíneo (Rangel y col., 2015; Golovkine y col., 2016).

El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa*. Este plásmido tiene la capacidad de conferir resistencia a cromato y mercurio a las bacterias que lo adquieren, además de que posee una isla genómica que contiene genes implicados en la virulencia (Ramírez Díaz y col., 2011; Rodríguez-Andrade y col., 2015).

Adicionalmente, el plásmido pUM505 posee un sistema Toxina-Antitoxina (TA) que participa en la estabilidad del plásmido, este sistema es codificado por los genes *pumA* (*orf123*) y *pumB* (*orf124*) (Hernández-Ramírez y col., 2018). La proteína PumB del

sistema PumAB TA se ha clasificado como una antitoxina de tipo HTH porque contiene un dominio de unión al ADN de HTH predicho, que es característico de la familia de antitoxinas Xre, mientras que la proteína PumA es una toxina putativa de tipo RelE, lo que sugiere que estos genes codifican un sistema híbrido TA, sugiriendo que PumB podría desempeñar un papel en la regulación de la transcripción de los genes del operón *pumAB*. (Hernández-Ramírez y col., 2017). Interesantemente, la proteína PumA es capaz de incrementar la virulencia de las bacterias que expresan el gen que la codifica, generando efectos tóxicos, los cuales son neutralizados por la antitoxina PumB (Hernández-Ramírez y col., 2017).

En la sangre, las bacterias se encuentran con el sistema inmunitario innato que está compuesto esencialmente por neutrófilos, monocitos y el sistema del complemento. La interacción entre *P. aeruginosa* y el sistema inmunitario innato ha sido estudiado utilizando principalmente cepas seleccionadas y componentes purificados, como las proteínas del complemento aisladas o fagocitos, o suero, en condiciones diferentes a las que se encuentran en la sangre humana. Aunado a esto, se ha descrito que la infección sistémica por *P. aeruginosa* puede conducir a su vez a la transmisión de patógenos, pero, los mecanismos que permiten que las bacterias persistan en la sangre siguen sin estar claros. Sin embargo, existen numerosos reportes que indican que la exposición a sangre o suero provoca cambios a nivel transcripcional de genes bacterianos que participan en la virulencia. Por ejemplo, en *Bordetella bronchiseptica*, la exposición a sangre o suero induce cambios en la expresión de sustanciales y genes asociados con la virulencia (Gestal y col., 2018). De manera similar en *S. aureus* la expresión de muchos factores de virulencia como hemolisinas, enterotoxinas, proteasas y factores para la

adquisición del hierro se incrementa en presencia de suero (Oogai y col., 2011). Mientras que en el hongo *M. circinelloides*, las esporas que son producidas en medio YPG suplementado con suero sanguíneo muestran mayor virulencia en comparación con las esporas crecidas sin la adición de suero sanguíneo (Patiño-Medina y col., 2019). Por otro lado, en *P. aeruginosa* la adición de suero aumentó significativamente la expresión de genes como *pvdS*, *regA* y los genes de síntesis de pioverdina, que están reprimidos por el hierro, mientras que redujo la expresión de genes de QS (normalmente asociados a virulencia), durante la fase exponencial temprana de crecimiento, mientras que aumentó la expresión de estos genes de QS en la fase tardía del crecimiento (Kruczeky col., 2014).

Dado que el sistema TA PumAB fue identificado en un plásmido, proveniente de una cepa de *P. aeruginosa* de origen clínico, el objetivo del presente trabajo fue determinar si el suero sanguíneo modificaba la virulencia conferida por el plásmido pUM505 y de la proteína PumA. Teniendo como antecedente que en *P. aeruginosa* el suero regula positiva o negativamente la expresión de genes de virulencia regulados por el sistema de QS (Kruczeky col., 2014), nuestro grupo planteó como hipótesis que el suero sanguíneo puede regular la virulencia conferida por el plásmido pUM505. Los datos obtenidos mostraron que en la bacteria *P. aeruginosa* transformada con el plásmido pUM505, el crecimiento en presencia de suero nativo modifica de manera negativa la virulencia que es conferida por dicho plásmido, indicando que los genes de virulencia codificados en pUM505 son modulados por componentes de suero sanguíneo. Este resultado fue inesperado, ya que los cultivos fueron obtenidos después de 18 horas de crecimiento, correspondiente a cultivos de la fase estacionaria de crecimiento, fase de crecimiento en la que otros grupos de trabajo reportaron que la presencia de suero

ocasionó el incremento de genes de virulencia regulados por QS (Kruczeky col., 2014). Además, nuestros datos mostraron que la desnaturalización del suero sanguíneo no afecta la virulencia que es conferida por la presencia de pUM505, sugiriendo que los factores que modulan a los genes de virulencia del plásmido pUM505 son termo sensibles. Derivado de este hallazgo, se procedió a analizar el efecto del suero sanguíneo en genes del plásmido pUM505 que se ha reportado previamente participan en la virulencia de la bacteria y son regulados por QS, para lo cual se realizó el análisis de su efecto en el sistema TA PumAB.

Los resultados mostraron que contrario a lo que ocurre con la virulencia conferida por pUM505, la presencia de suero nativo en el medio de cultivo no modificó la virulencia conferida por la toxina PumA, ya que la cepa *P. aeruginosa* PAO1 pumA mostró ser igual de virulenta después de ser crecida en presencia o ausencia de 10% de suero nativo, aunque se pudo apreciar una ligera disminución de la virulencia de PumA en los últimos tiempos del ensayo del cultivo crecido en presencia de 20% de suero nativo. Este último resultado muestra un efecto similar a la disminución de la virulencia conferida por el plásmido pUM505 por la presencia del suero nativo, sugiriendo que el suero nativo regula de manera negativa los genes de virulencia codificados en el plásmido pUM505. Como ha sido descrito se ha sugerido que la toxina PumA es un factor de virulencia bacteriano ya que es capaz de aumentar la virulencia y la invasibilidad de *P. aeruginosa* PAO1, tanto en modelo de ratón como en lechuga (Hernández-Ramírez y col., 2018). Por otro lado, la virulencia conferida por la toxina PumA se vio modificada por la presencia de suero desnaturalizado, el crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 pumA con 20% de suero desnaturalizado generó menor virulencia en la cepa, sugiriendo que

al ser desnaturalizados algunos de los componentes termosensibles del suero, podrían quedar libres algunos componentes del suero que a su vez impiden que la toxina actúe como un factor de virulencia. Por lo que sería importante analizar la expresión del gen *pumA* en presencia y ausencia del suero nativo o desnaturalizado, así como identificar componentes del suero implicados en la regulación. Adicionalmente, los resultados indicaron que la adición de suero ya sea nativo o desnaturalizado generó la disminución de la capacidad de virulencia conferido por el sobrenadante de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 *pumA*, sugiriendo que componentes del suero (no termosensibles) pueden regular negativamente la virulencia conferida por la toxina PumA, esta regulación podría ser a nivel de la expresión del gen o bien a nivel de regulación de secreción de la toxina, por lo que más estudios son requeridos.

Por otra parte, se determinó que el suero sanguíneo también modula la función de la antitoxina PumB, pues la adición de suero ya sea nativo o desnaturalizado al medio de cultivo tuvo como consecuencia el aumento de la virulencia de las cepas *P. aeruginosa* POA1 *pumB* y *P. aeruginosa* PAO1 *pumAB*. La antitoxina PumB es capaz de neutralizar los efectos tóxicos de la toxina PumA, por lo que al estar presente el sistema completo PumAB la toxina no es capaz de generar efectos tóxicos a la bacteria que lo contiene, así como tampoco incrementar la virulencia de la bacteria (Hernández-Ramírez y col., 2018). Esto sugiere que componentes del suero no termosensibles pueden regular negativamente la función de PumB, lo que ocasiona que este no pueda actuar sobre la toxina PumA.

En conjunto este trabajo demostró que el suero sanguíneo regula de manera compleja a los genes de virulencia codificados en el plásmido pUM505.

## CONCLUSIÓN

El suero sanguíneo modula la función de la antitoxina PumB y virulencia conferida por la toxina PumA del sistema TA PumAB del plásmido pUM505.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beceiro, A., Tomás, M. y Bou, G. (2012) Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿Una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *ELSEVIER*, 30(8), 492-499. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-antimicrobianos-virulencia-una-asociacion-S0213005X12000535>
2. Brooks, G.F. (2008). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. (1ª ed). Cd. México: Editorial Manual Moderno.
3. Cardona, C., Santa, C. y De la Calle, R. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *SciELO*, 26(1). [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-87052012000100005](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052012000100005)
4. Cedujo, A.G., Tejada, M., Camargo, A., Higuera, J.J., Mariscal, V. y Fernández, E. (2010). Aislamiento y purificación del DNA de un plásmido recombinante. [https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/39\\_AISLAMIENTO\\_Y\\_PURIFICACION\\_DEL\\_DNA\\_DE\\_UN\\_PLASMIDO\\_RECOMBINANTE.pdf](https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/39_AISLAMIENTO_Y_PURIFICACION_DEL_DNA_DE_UN_PLASMIDO_RECOMBINANTE.pdf)
5. Cervantes, C. (2019). El maravilloso mundo de las bacterias. *Saber más revista de divulgación*. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/165-numero-219/325-el-maravilloso-mundo-de-las-bacterias.html>
6. Cervantes, C., Caballero Flores, G.G., Silva Sánchez, J. y Ramírez Díaz, M. I. (2012). Distribución de los genes *chrA* en bacterias de origen nosocomial. *Ciencia Nicolaita*, (56), 79–92. <https://www.cic.cn.umich.mx/cn/article/view/112>

7. Gestal, M.C., Rivera, I., Howard, L.K., Dewan, K.K., Hamidou, Soumana. I., Dedloff, M., Nicholson, T.L., Linz, B. y Harvill, E.T. (2018). Blood or Serum Exposure Induce Global Transcriptional Changes, Altered Antigenic Profile, and Increased Cytotoxicity by Classical *Bordetellae*. *Front. Microbiol.*, 9, 1969. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01969>
8. Golovkine, G., Faudry, E., Bouillot, S., Elsen, S., Attree, I. y Huber, P. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* Transmigrates at Epithelial Cell-Cell Junctions, Exploiting Sites of Cell Division and Senescent Cell Extrusion. *PLoS Pathog*, 12(1):e1005377. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005377>
9. Heredia-Díaz, Y., Machado-García, R., Mendoza-Suárez, M., Jardines-Cala. D. y Vázquez-Domínguez, A. (2016). Desproteínización de muestras de suero y plasma para el estudio analítico de carbamazepina. *Revista Cubana de Química*, 28(3), 875. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2224-54212016000300010#:~:text=Para%20la%20desproteinizaci%C3%B3n%20de%20muestras,pero%20no%20para%20sus%20metabolitos](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212016000300010#:~:text=Para%20la%20desproteinizaci%C3%B3n%20de%20muestras,pero%20no%20para%20sus%20metabolitos).
10. Hernández-Ramírez K.C. (2015). Análisis funcional de los genes que codifican al sistema toxina-antitoxina del plásmido pUM505. [Tesis maestría]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
11. Hernández-Ramírez, K.C. (2019). Plásmidos bacterianos. *Saber más Revista de Divulgación*. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/283-numero-33/510-plasmidos-bacterianos.html>
12. Hernández-Ramírez, K.C., Chávez-Jacobo, V.M., Valle-Maldonado, M.I., Patiño-Medina, J.A., Díaz-Pérez, S.P., Jácome-Galarza, I.E., Ortiz-Alvarado, R., Meza-

- Carmen, V. y Ramírez-Díaz, M.I. (2017). Plasmid pUM505 encodes a Toxin-Antitoxin system conferring plasmid stability and increased *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb Pathog*, 112, 259-268. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28970172/>
13. Hernández-Ramírez, K.C., Reyes-Gallegos, R.I., Chávez-Jacobo, V.M., Díaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V. y Ramírez-Díaz, M.I. (2018). A plasmid-encoded mobile genetic element from *Pseudomonas aeruginosa* that confers heavy metal resistance and virulence. *Plasmid*, 98, 15-21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30063910/>
14. Hernández-Ramírez, K.C., Valerio-Arellano, B., Valle-Maldonado, M.I., Ruíz-Herrera, L.F., Meza-Carmen, V. y Ramírez-Díaz, M.I. (2020) Virulence Conferred by PumA Toxin from the Plasmid-Encoded PumAB Toxin-Antitoxin System is Regulated by Quorum System. *Curr Microbiol*, 77(9), 2535-2543. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32556478/>
15. Kern, W.V., Rieg, S. (2020). Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. *Clin Microbiol Infect*, 26(2), 151-157. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31712069/>
16. Kruczek, C., Qaisar, U., Colmer-Hamood, J. y Hamood, A. (2014). Serum influences the expression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing genes and QS-controlled virulence genes during early and late stages of growth. *Microbiologyopen*, 3(1), 64-79. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24436158/>
17. Lasa, I., Del Pozo, J.L., Penadés, J.R. y Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *SciELO*, 28(2). [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272005000300002](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002)

18. Lewin, B. (2008). *Genes IX*. (9° ed) McGraw-Hill.
19. Li, L.L., Malone, J.E. y Iglewski B.H. (2007). Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *J Bacteriol.* 189, 4367-4374.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1913358/>
20. Loeza, P., Valdez, J., Baizabal, V. y López, J. (2004) Mecanismos de replicación de los plásmidos bacterianos, *UNAM*, 23(2), 71-78.  
[http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2004/06/71-78\\_PEDRO\\_D.pdf](http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2004/06/71-78_PEDRO_D.pdf)
21. Marcano, D. (2008). El lado positivo de las bacterias. *SciELO*, 39(2).  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-04772008000200009#:~:text=Para%20la%20biorremediaci%C3%B3n%2C%20el%20uso,limpiar%20ambientes%20contaminados%3B%20por%20ejemplo%2C](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772008000200009#:~:text=Para%20la%20biorremediaci%C3%B3n%2C%20el%20uso,limpiar%20ambientes%20contaminados%3B%20por%20ejemplo%2C)
22. Montalvo, C.E., Nájera, F.P. y Hernández, T. (2013) Tejido Sanguíneo y Hematopoyesis.  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/Tejido-sanguineo.pdf>
23. Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2014). *Microbiología médica*. (1era ed). Barcelona: Elsevier.
24. Narváez, P., Pedroza, R., Alonso, G. y Rodríguez, V. (2005). Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *SciELO*, 24(1).  
[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562005000100006](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100006)

25. Ochoa, S.A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L.B., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R. y Xicohtencatl-Corte, J. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *SciELO*, 70(2). [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-11462013000200010#:~:text=La%20resistencia%20a%20carbapen%C3%A9micos%20en,pili%20tipo%20IV%20\(T4P\)](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000200010#:~:text=La%20resistencia%20a%20carbapen%C3%A9micos%20en,pili%20tipo%20IV%20(T4P))
26. Oogai, Y., Matsuo, M., Hashimoto, M., Kato, F., Sugai, M., y Komatsuzawa, H. (2011). Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. *Applied and environmental microbiology*, 77(22), 8097–8105. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.05316-11>
27. Patiño-Medina, A., Vargas-Tejeda, D., Valle-Maldonado, M., Alejandre-Castañeda, V., Jácome-Galarza, I., Villegas-Moreno, J., Nuñez-Anita R., Ramírez-Díaz, M.I., Ortiz-Alvarado R. y Meza-Carmen, V. (2019). Sporulation on blood serum increases the virulence of *Mucor circinelloides*. *ELSEVIER*, 137(57). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401019307788>
28. Paz-Zarza, V.M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D., Solano-Gálvez S.G. y Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *SciELO*, 36(2). [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182019000200180](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180)

29. Pelczar, M., Reid, R.D. y Chan, E.C.S. (1972) *Microbiología*. (1ª ed). Cd. México: McGRAW-HILL.
30. Perea, E.J. (1992) *Enfermedades de transmisión sexual*. Barcelona: Doyana,
31. Pont, S., Fraikin, N., Caspar, Y., Van Melderen, L., Attree, I. y Cretin, F. (2020) Bacterial behavior in human blood reveals complement evaders with some persister-like features. *PLoS Pathog*, 16(12):e1008893. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008893>
32. Ramírez Diaz, M. I. y Cervantes, C. (2015). Genes de adaptación localizados en el plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa*. *Ciencia Nicolaita*, (64), 8–21. <https://www.cic.cn.umich.mx/cn/article/view/202>
33. Ramírez-Díaz, M.I., Díaz-Magaña, A., Meza-Carmen, V., Johnstone, L., Cervantes, C., y Rensing, C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid*, 66(1), 7–18. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147619X11000217?via%3Dihub>
34. Rangel, S.M., Diaz, M.H., Knoten, C.A., Zhang, A. y Hauser, A.R. (2015). The Role of ExoS in Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during Pneumonia. *PLoS Pathog*, 11(9):e1004945. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004945>
35. Repullo, J.L., Moyano, E. y Muñoz, J. (2020). Purificación de ADN plasmídico y electroforesis del mismo en gel de agarosa. <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/38%20PURIFICACION%20DNA%20PLASMIDO.pdf>

36. Rodríguez-Andrade (2015). Identificación de los genes del plásmido pUM505 que participan en la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. [Tesis de Maestría]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
37. Salyers, A.A. (1994). *Bacterial pathogenesis: A molecular approach*. (6<sup>a</sup> ed). Washington: ASM Press.
38. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (2<sup>o</sup> ed). Cold Spring Harbor.
39. Singleton, P. (1999). *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. (5<sup>o</sup> ed). Wiley.
40. Tortora, G. y Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología*. (13<sup>o</sup> ed). Cd. México: Panamericana.