



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE LA VIRULENCIA CONFERIDA POR EL
PLÁSMIDO pUM505 DE RESISTENCIA A CIPROFLOXACINA
EN RESPUESTA A GLUCOSA Y SUERO SANGUÍNEO**

TESIS

Para obtener el título de:
Química Farmacobiología

Presenta:

p.Q.F.B. Diana Jacqueline Rocha Lara

Asesora:

D.C. Martha Isela Ramírez Díaz

Co- asesor:

D.C. Víctor Meza Carmen

Morelia Mich. Junio del 2023

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

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
2. RESUMEN.....	9
3. Abstract	10
4. INTRODUCCIÓN.....	11
4.1 BACTERIAS.....	11
4.1.1 Estructura de bacterias.....	11
4.1.2 Clasificación de bacterias	12
4.2 VIRULENCIA DE LAS BACTERIAS.....	13
4.2.1 Fase temprana de la infección.....	13
4.2.2 Fase tardía de la infección.....	14
4.3 <i>P. aeruginosa</i>	15
4.3.1 <i>P. aeruginosa</i> PAO1	16
4.4 FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>P. aeruginosa</i>	16
4.4.1 Quorum sensing:	18
4.5 PLÁSMIDOS	21
4.6 SANGRE.....	23
4.6.1 Funciones y composición de la sangre.....	23
4.7 SUERO SANGUÍNEO.....	25
4.7.1 Efecto del suero sanguíneo en la virulencia en microorganismos	25
4.8 GLUCOSA.....	25
4.8.1 Efecto de la glucosa en la virulencia de microorganismos	26
4.9 SISTEMA TOXINA-ANTITOXINA (TA)	27
4.9.1 Características generales de los sistemas TA.....	27
5. ANTECEDENTES.....	30
6. JUSTIFICACIÓN.....	36
7. HIPOTESIS.....	36
8. OBJETIVO GENERAL.....	37

9. OBJETIVOS ESPECIFICOS	37
10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	38
11. MATERIALES Y MÉTODOS	41
11.1 Medios de cultivo	41
11.2 Cepas.....	41
11.3 Suero	42
11.4 Glucosa.....	42
11.5 Cultivos celulares	42
11.6 Obtención de extractos libres de células.....	42
11.7 Virulencia en el modelo de nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	42
12. RESULTADOS	44
12.1 Efecto del suero sanguíneo en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	44
12.2 Efecto del sobrenadante de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 crecido en presencia de suero sanguíneo en la virulencia	44
12.3 Efecto de la adición de suero sanguíneo en la virulencia conferida por genes del plásmido pUM505 en crecimiento con alta concentración de glucosa.	47
12.4 Efecto del sobrenadante de <i>P. aeruginosa</i> pumAB, <i>P. aeruginosa</i> pumA y <i>P. aeruginosa</i> pumB crecidos en presencia de suero nativo en la concentración.....	47
12.5 Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo.....	50
12.6 Efecto del sobrenadante de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo	50
12.7 Efecto de una menor concentración de glucosa al en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo	54
12.8 Efecto del sobrenadante una menor concentración de glucosa en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo	55
12.9 Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo en los genes del plásmido pUM505....	58
12.10 Efecto del suero sanguíneo nativo al 5% en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con la toxina PumA, la antitoxina PumB y la toxina-antitoxina PumAB	58
13. DISCUSIÓN	61
14. CONCLUSIONES.....	67
15. BIBLIOGRAFIA	68



1. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo del sistema de Quorum Sensing en <i>P. aeruginosa</i>	22
Figura 2. Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	23
Figura 3. Esquema del funcionamiento del sistema Toxina-Antitoxina TA	31
Figura 4. Esquema del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i>	33
Figura 5. Efecto de la virulencia del plásmido pUM505 en <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en el modelo de infección en hojas de lechuga.....	34
Figura 6. Sistema TA del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i>	35
Figura 7. Efecto de la adición de suero sanguíneo en la virulencia conferida por los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505.....	37
Figura 8. Efecto del suero nativo en la virulencia	47
Figura 9. Efecto del sobrenadante de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> crecidas en presencia de suero en la virulencia	48
Figura 10. Efecto del suero nativo en la virulencia conferida por el sistema toxina-antitoxina PumAB del plásmido pUM505.....	50
Figura 11. Efecto del sobrenadante de cultivos creados en presencia de suero nativo en la virulencia conferida por el sistema toxina-antitoxina PumAB del plásmido pUM505.....	51
Figura 12. Efecto de la glucosa al 0.5% en la virulencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> crecidas en presencia o ausencia de suero sanguíneo.....	54
Figura 13. Efecto de la glucosa al 0.5% en la virulencia de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	55
Figura 14. Efecto de la glucosa al 0.2% en la virulencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	58

Figura 15. Efecto del sobrenadante de cultivos crecidos en M9 con glucosa al 0.2% en la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa*.....59

Figura 16. Efecto de la glucosa al 0.2% en la virulencia conferida por el sistema toxina-antitoxina PumAB del plásmido pUM505.....61

Figura 17. Efecto del sobrenadante de cultivos crecidos en M9 con glucosa al 0.2% en la virulencia conferida por el sistema toxina-antitoxina del plásmido pUM505.....62



2. RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista, Gram negativa, ubicua, se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente, tanto en el suelo como en el agua. Es considerada una de las bacterias patógenas de mayor resistencia a antibióticos según la Organización Mundial de la Salud (OMS). *P. aeruginosa* 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 de *P. aeruginosa* incrementa la virulencia al ser transferido a la cepa de referencia *P. aeruginosa* PAO1. El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica y posee genes previamente relacionados con la virulencia, como los genes *pumA* y *pumB* que codifican a las proteínas PumA y PumB, respectivamente, que constituyen un sistema toxina-antitoxina que participa en la virulencia. La proteína PumA aumenta la virulencia de la bacteria gracias a sus efectos tóxicos los cuales son regulados por la proteína PumB. La proteína PumA pertenece a la familia de toxinas RelE. La proteína PumB codifica un regulador putativo de 96 aminoácidos, correspondiente a la antitoxina HTH que pertenece a la familia de antitoxinas Xre. La toxina PumA es capaz de incrementar la virulencia de *P. aeruginosa* en hoja de lechuga, el nematodo *Ceanorhabditis elegans* y en ratón, efecto que es neutralizado por la antitoxina. Aunado a esto, se ha demostrado que la presencia de suero sanguíneo aumenta la virulencia, así como los cambios en la concentración de glucosa, modifican la virulencia. El objetivo de este proyecto fue determinar si los cambios en la concentración de glucosa del medio, así como la presencia de suero aumentan la virulencia conferida por el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*.

Palabras clave: *P. aeruginosa*, virulencia, toxina, suero sanguíneo, glucosa.

3. ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic, Gram-negative, ubiquitous bacterium, widely distributed in the environment, both in soil and water. It is considered one of the most antibiotic resistant pathogenic bacteria according to the World Health Organization (WHO). *P. aeruginosa* has been classified as one of the most important bacteria in the medical field, as it is responsible for most hospital-acquired infections. *P. aeruginosa* plasmid pUM505 increases virulence when transferred to the reference strain *P. aeruginosa* PAO1. The pUM505 plasmid was isolated from a clinical strain and possesses genes previously related to virulence, such as the *pumA* and *pumB* genes encoding the PumA and PumB proteins, respectively, which constitute a toxin-antitoxin system involved in virulence. The PumA protein increases the virulence of the bacterium due to its toxic effects which are regulated by the PumB protein. The PumA protein belongs to the RelE family of toxins. The PumB protein encodes a 96 amino acid putative regulator, corresponding to the HTH antitoxin that belongs to the Xre family of antitoxins. PumA toxin is able to increase the virulence of *P. aeruginosa* in lettuce leaf, the nematode *Ceanorhabditis elegans* and in mice, an effect that is neutralized by the antitoxin. In addition, it has been shown that the presence of blood serum increases virulence, as well as changes in glucose concentration modify virulence. The objective of this project was to determine whether changes in the glucose concentration of the medium as well as the presence of serum increase the virulence conferred by *P. aeruginosa* plasmid pUM505.

4. INTRODUCCIÓN

4.1 BACTERIAS

Las bacterias se consideran microorganismos procariotas unicelulares, los cuales son los más abundante en el mundo (Cervantes, 2019), pueden encontrarse en la mayoría de los hábitats, como lo es en el suelo, aire o en el agua, a altas temperaturas, ácidos o inclusive en desechos radioactivos y su reproducción es por fisión binaria (asexual). Las bacterias producen sus propios mecanismos de energía y material genético para poder desarrollarse y crecer (Marcano, 2008). Estos organismos no tienen núcleo, ni poseen orgánelos membranosos internos, su pared celular está compuesta por peptidoglicano, la mayoría de las bacterias poseen flagelos, no cuentan con citoesqueleto (Fernández, 2013), y su DNA es en forma de un círculo cerrado (Pírez y Mota, 1999). Su tamaño va de un desde 0,1 μm hasta 10 μm , aunque la mayoría de las bacterias poseen una media de 1 μm (Murray, y col. 2013; Pírez y Mota, 1999).

Las bacterias se diferencian de acuerdo a la forma que presenten:

- Cocos: su forma es esférica, casi no se relacionan con el exterior, cohabitan en medios ricos en nutrientes; se transmiten por el aire y son resistentes patógenos.
- Bacilos: su forma es alargada, no necesitan medios ricos en nutrientes además poseen mayor resistencia a antibióticos
- Helicoidales: se encuentran los vibrios, espirilos y las espiroquetas, los cuales poseen formas de hélice, habitan en medios viscosos por lo que atraviesan con gran facilidad las mucosas y son transmisibles por contacto (Fernández, 2013).

4.1.1 Estructura de bacterias

Las bacterias están constituidas por la cápsula, la cual se encuentra principalmente en bacterias patógenas que aporta protección de la fagocitosis, se encuentra localizada

fuera de la pared celular. La pared celular se encuentra por fuera de la membrana plasmática, siendo una envoltura de peptidoglicano, la pared celular permite diferenciar bacterias Gram positivas de las Gram negativas. La membrana plasmática bacteriana se caracteriza por tener pliegues internos llamados mesosomas, los cuales se encargan de procesos metabólicos. Los ribosomas se encuentran libres en el citoplasma y participan en la síntesis de proteínas y el ácido desoxirribonucleico. El nucleóide también conocido como cromosoma bacteriano, comprende gran parte del DNA de la bacteria, algunas bacterias contienen plásmidos, que son fragmentos de DNA extracromosomal en forma de círculo. Los flagelos son filamentos proteicos que aportan movilidad a la bacteria y las fimbrias o pilli son estructuras filamentosas huecas, que se diferencian de los flagelos ya que poseen un tamaño menor y su propósito es el intercambio de material genético (Fernández, 2013; Pérez y Mota, 1999) (Figura 2).

4.1.2 Clasificación de bacterias

Las bacterias se pueden ordenar por diferentes aspectos como: su forma, tamaño estructura, crecimiento, sus propiedades químicas y metabólicas, genotipo, antígenos, por sus características macroscópicas y microscópicas o por su propiedad de captar la tinción Gram; siendo esta cualidad la más utilizada para diferenciar a las bacterias (Murray y col., 2013; Singleton, 1999).

Las bacterias Gram positivas destacan por que se tiñen de azul o morado, es ya que el colorante (cristal violeta) se fija a la pared celular de la bacteria la cual está constituida por una capa gruesa de peptidoglicano.

Las bacterias Gram negativas tienden a teñirse de color rojo, esto es debido a que a diferencia de las bacterias Gram positivas, las bacterias Gram negativas presentan dos

membranas plasmáticas, por lo que su pared celular es más redundante que la pared celular de las bacterias Gram positivas, por lo que no pueden retener el colorante (safranina) con la misma eficacia que las bacterias Gram positivas (Fernández, 2013; Murray y col., 2013).

4.2 VIRULENCIA DE LAS BACTERIAS

La virulencia cuantifica el grado de patogenicidad que presenta un agente infeccioso de acuerdo a su tasa de letalidad, invasividad, lesionar los tejidos del huésped, etc. (Weigel y col., 2003). Las bacterias presentan diferentes características de patogenicidad que le dan acceso al entorno del hospedero, los cuales se dividen en 2 grupos (Meylan y col., 2006).

4.2.1 Fase temprana de la infección

Las bacterias pueden ingresar al hospedero de diferentes vías como a través de las mucosas, la piel o por las membranas y dependiendo de su forma de acceso podrá causar sí o no enfermedad (Meylan y col., 2006).

Al ingresar al hospedero, la bacteria debe adherirse a las células del tejido para no ser desechadas (Wu y col., 2008). Esta unión al tejido del hospedero se da mediante moléculas del patógeno llamada adhesinas o ligandos. La bacteria se une a través de receptores los cuales pueden aumentar la capacidad de la virulencia (Meylan, y col., 2006). Las bacterias pueden presentar varios tipos de adhesinas, como los pilis, las fimbrias o los flagelos conocidos como fimbriales, o las proteínas de membrana externa o el ácido lipoteicoico y las proteínas F y M, la cuales son conocidas como adhesinas afimbriales (Klausen y col., 2003; Murray y col., 2013). Las bacterias pueden agruparse

y fijarse en la superficie de zonas bióticas y abióticas, estas agrupaciones se le conocen como biopelículas o biofilm (Murray y col., 2013). Además, también pueden llegar a tejidos importantes por la vía endocítica a través de las células M (Yu y col., 2010). Las bacterias se pueden desplazar mediante el uso del flagelo, el cual es un suplemento largo en un extremo que le permite moverse en superficies mucosas que se caracterizan por secretar líquido, el flagelo les permite a las bacterias móviles poderse transportar y colonizar. Las fimbrias o pilis son pequeños agregados presentes únicamente en la membrana externa de bacterias Gram negativas, que se caracterizan por dar soporte a las adhesinas (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003). Muchas de las bacterias Gram negativas presentan sistemas de secreción de proteínas, donde utilizan fimbrias para unirse a la célula e inyectar proteínas (Lioy y col., 2002). La secreción en las bacterias Gram negativas se clasifica en 2 clases compuestas, por tres tipos de sistema de secreción con base a su medio de transporte, En las vías Sec-dependientes, las proteínas que se secretan usan una secuencia señal en el extremo amino terminal y las vías Sec-independientes es donde los sustratos se traslocan del citosol al exterior de la célula (Lioy y col., 2002).

4.2.2 Fase tardía de la infección

Las bacterias necesitan de hierro para su crecimiento, pero la escasa concentración de hierro libre, obliga a la bacteria a secretar sideróforos, que son proteínas capaces de atrapar con gran afinidad el hierro, además algunas bacterias poseen la capacidad de producir toxinas para matar a células vecinas y de esta manera obtener hierro (Lambris y col., 2008; Zipfel y col., 2007). Las bacterias presentan un mecanismo que le da movilidad intracelular, donde interacciona para evitar los procesos inmunes (Weigel y col., 2003).

Algunas bacterias tienen capsula que es una capa localizada en la superficie de la bacteria que aporta protección a la misma y tiene la capacidad de lesionar el tejido de la superficie (Murray, y col., 2013). También presentan un proceso conocido como variación antigénica el cual consiste en alterar sus antígenos una vez que el hospedero activa la respuesta inmunitaria para no ser detectados y no ser afectados (Lambris y col., 2008; Zipfel y col., 2007).

4.3 *P. aeruginosa*

Pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* en el orden *Pseudomonadales*. El género fue descrito por Walter Migula en 1895 del Bacteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe en una publicación donde se mencionaba como “células con órganos polares” (Migula, 1895). *P. aeruginosa* se aisló por primera vez en 1872 por Schroeter quien lo nombró de acuerdo a la palabra “*aeruginoso*” que significa el color de cobre oxidado por su característica pigmentación (Palleroni, 1984).

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa en forma de bastos con medidas de 0,5-1 µm de diámetro y 1,5-5 µm de largo (Peix y col., 2009), posee una coloración azul verdoso debido a la producción de pirocianina responsable de varios efectos citoplasmáticos (May y col., 1991). Es un microorganismo causante de infecciones nosocomiales oportunistas y abarca del 10-15% de las infecciones nosocomiales del mundo (Gellatly y Hancock, 2013; Yordanov y Strateva, 2009). Esta bacteria se caracteriza por requerir el mínimo de nutrientes, tolerar concentraciones bajas de oxígeno, sobrevivir en temperaturas de 4-42°C y por tener gran resistencia a diversos antibióticos. Esta cualidad le permite sobrevivir en la instrumentación medica facilitando

su infección en pacientes inmunocomprometidos, como en pacientes con quemaduras o con fibrosis quística (Elliott, 2017). Referente a lo anterior la mayoría de las infecciones se dan por el uso de catéteres urinarios, catéteres intravenosos o tubos endotraqueales (Pollack, 2002; Stover y col., 2000). *P. aeruginosa* ocasiona neumonía, infecciones urinarias, bacteremias, etc., es responsable de un alto porcentaje de mortalidad en pacientes con fibrosis quística y puede provocar daño a nivel pulmonar en infecciones crónicas (Breidenstein y col., 2011). Puede vivir en medios anaerobios usando el nitrógeno, además es incapaz de fermentar la lactosa (Yordanov y Strateva, 2009) puede producir proteasas y elastasas que degradan a las proteínas inmunoreguladoras, las inmunoglobulinas y péptidos (Driscoll y col., 2007).

4.3.1 *P. aeruginosa* PAO1

Para la rama de la investigación *P. aeruginosa* PAO1, posee el genoma bacteriano más grande secuenciado, además, es la cepa más utilizada ya que es un patógeno oportunista ubicuo y metabólicamente versátil. Se obtuvo de un aislado PAO australiano. En el 2000 se secuenció y a partir de la fecha se ha actualizado la información, ayudando a la aceleración de fármacos y vacunas contra *P. aeruginosa* (Klockgether y col., 2010).

4.4 FACTORES DE VIRULENCIA DE *P. aeruginosa*

Esta bacteria es considerada una de las bacterias causante del mayor porcentaje de infecciones intrahospitalarias, esta propiedad es gracias a que presenta una gran variedad de factores de virulencia. Los factores de virulencia se dividen en dos grupos:

- Factores pertenecientes de la célula bacteriana

Flagelo. *P. aeruginosa* posee de un flagelo el cual aporta movilidad a la bacteria El flagelo provee a la proteína Flagelar FliD que le da a la bacteria la facultad de adherirse a las mucosas de la vía respiratoria (Arora y col., 1998) y al glicosfingolípido M1 de las células epiteliales (Al-Wrafy y col., 2016). El flagelo también posee una proteína flagelar denominada FliC, responsable de secretar péptidos antimicrobianos al sistema inmunológico, para posteriormente ocasionar muerte celular piroptótica (muerte celular por la infección de patógenos) por la vía de NFκB (Cendra y col., 2017; Kipnis y col., 2006). Además *P. aeruginosa* anula la regulación del gen que codifica a la proteína flagelina produciendo alginato que causa daño parenquimatoso y evitando la respuesta inflamatoria (Chotirmall y col., 2012; Rada, 2017). *P. aeruginosa* posee un pilli tipo IV capaz de adherirse y genera movilidad de la bacteria de tipo swarming (movilidad superficial empujado por el flagelo rotando en forma de hélice) el pilli posee cuatro proteínas PilA, PilB, PilT y PilU. Además, el pili IV incorpora las lectinas LEcA y LecB, las cuales causan daño multiplicando al patógeno (Al-Wrafy y col., 2016; Persat y col., 2015).

Factores pertenecientes secretados por la célula bacteriana

P. aeruginosa es capaz de producir la acción de una capsula de alginato, además *P. aeruginosa* forma una biopelícula por medio de los cuales esquivan la acción de los anticuerpos (Faezi y col., 2017). *P. aeruginosa*, puede formar 2 tipos de biopelículas: 1) las biopelículas estructuradas o maduras, son estructuras celulares con separaciones. 2) las biopelículas planas o iniciales que se da por la unión de varias bacterias en la superficie (Kirisits y Parsek, 2006) (Figura 2).

P. aeruginosa posee 5 tipos de sistemas de secreción de los cuales 3 son los más importantes. El sistema de secreción tipo III secreta toxinas importantes como Exo A,

Exo T, Exo S, Exo U, y ExoY (Woong y col., 2009). El sistema de secreción tipo II participa en la secreción de la elastasa LasA y LasB que destruyen el colágeno para facilitar la infección ya que inhibe las barreras físicas (Al-Wrafy col., 2016). El sistema de secreción tipo V es el responsable del pigmento azul verdoso característico de *P. aeruginosa*, que recibe el nombre de piocianina, el cual produce disfunción ciliar en el tracto respiratorio que a su vez provoca inflamación y daño celular al interrumpir la cadena transportadora de electrones mitocondriales (Al-Wrafy y col., 2016) (Figura 2).

4.4.1 Quorum sensing

“Quorum sensing” (QS), es un mecanismo de comunicación intercelular del cual depende una población bacteriana, el mecanismo de QS además de regular diversos factores de virulencia como proteasas, exotoxina A, ramnolipidos y sideróforos, lleva a cabo la producción y liberación de autoinductores capaces de aumentar el comportamiento de la bacteria en función de la densidad bacteriana, ayuda a controlar la expresión de genes que participan en la transferencia de plásmido, bioluminiscencia y movilidad en la expresión de factores de virulencia como proteasas, elastasas y piocianina, en el movimiento bacteriano tipo swarming y la formación de biofilm (Diggle y col., 2007; Waters y Bassler, 2005). *P. aeruginosa* cuenta con dos sistemas de QS, que sintetizan las acil homoserín lactonas N-3-oxo-dodecanoyl homoserín lactona (3OC12-HSL) y N-butanoyl-L-homoserín lactona (C4-HLS) (Waters y Bassler, 2005).

Se ha descrito que el sistema de QS controla la expresión de genes de resistencia a antibióticos, esto gracias a la adición exógena del autoinductor C4- HSL que mejora la expresión de los genes del sistema MexAB-OprM de resistencia a quinolonas (Maseda y col., 2004). *LasI* produce el primer autoinductor (3OC12-HSL), este se une a *LasR*, el cual

es un complejo que puede activar genes diana, donde se encuentra el gen *lasI*, el cual tiene una retroalimentación positiva activando de esta manera el primer sistema. Por otro lado, *LasR* también activa la expresión de los genes *rhIR* y *rhII*, que pertenecen al segundo sistema de QS. *RhII* produce al segundo autoinductor (C4-HLS), el cual se aglomera y se une a *RhIR*; reactivando la expresión de los genes *rhIR* y *rhII* y produciendo factores de virulencia (Waters y Bassler, 2005) (Figura 1).

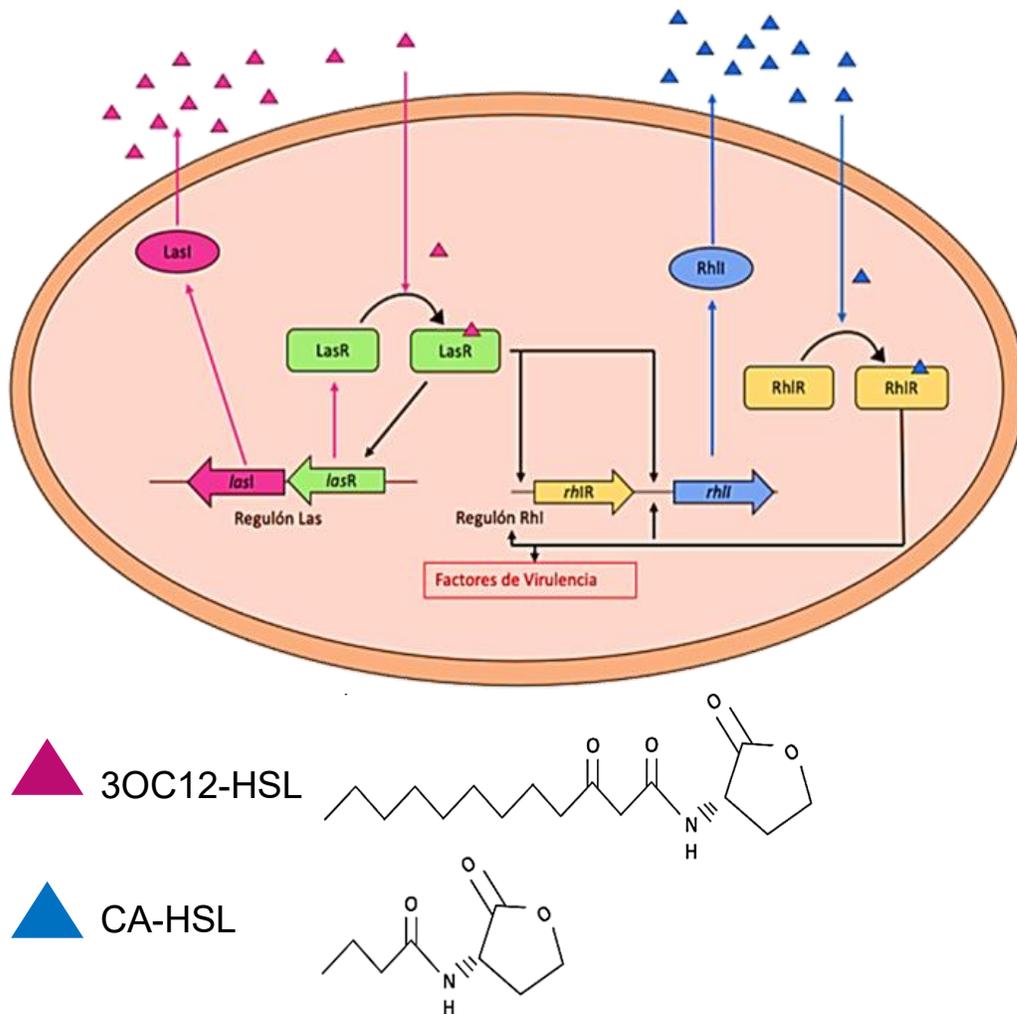


Figura 1. Mecanismo del sistema de Quorum Sensing en *P. aeruginosa*. Los dos sistemas de QS en *P. aeruginosa* se muestran en color rosa y azul en forma de círculo. El gen *lasR* y las proteínas receptoras que forman el complejo autoinductor. *LasR* se muestra de color verde. El gen *lasI* y la proteína *LasI* que produce la primera AHL se muestran de color rosa. Las AHL 3-oxo-C12-HSL se muestran con triángulos de color rosa. El gen *lasR* y la proteína *LasR* se muestran de color verde. El gen *rhIR* junto con el complejo autoinductor *RhIR* se muestran de color amarillo. El gen *rhII* y la proteína *RhII* que produce la segunda AHL se muestran de color azul. Las AHL C4-HLS se muestran con triángulos de color azules. (Modificado de Waters y col., 2005).

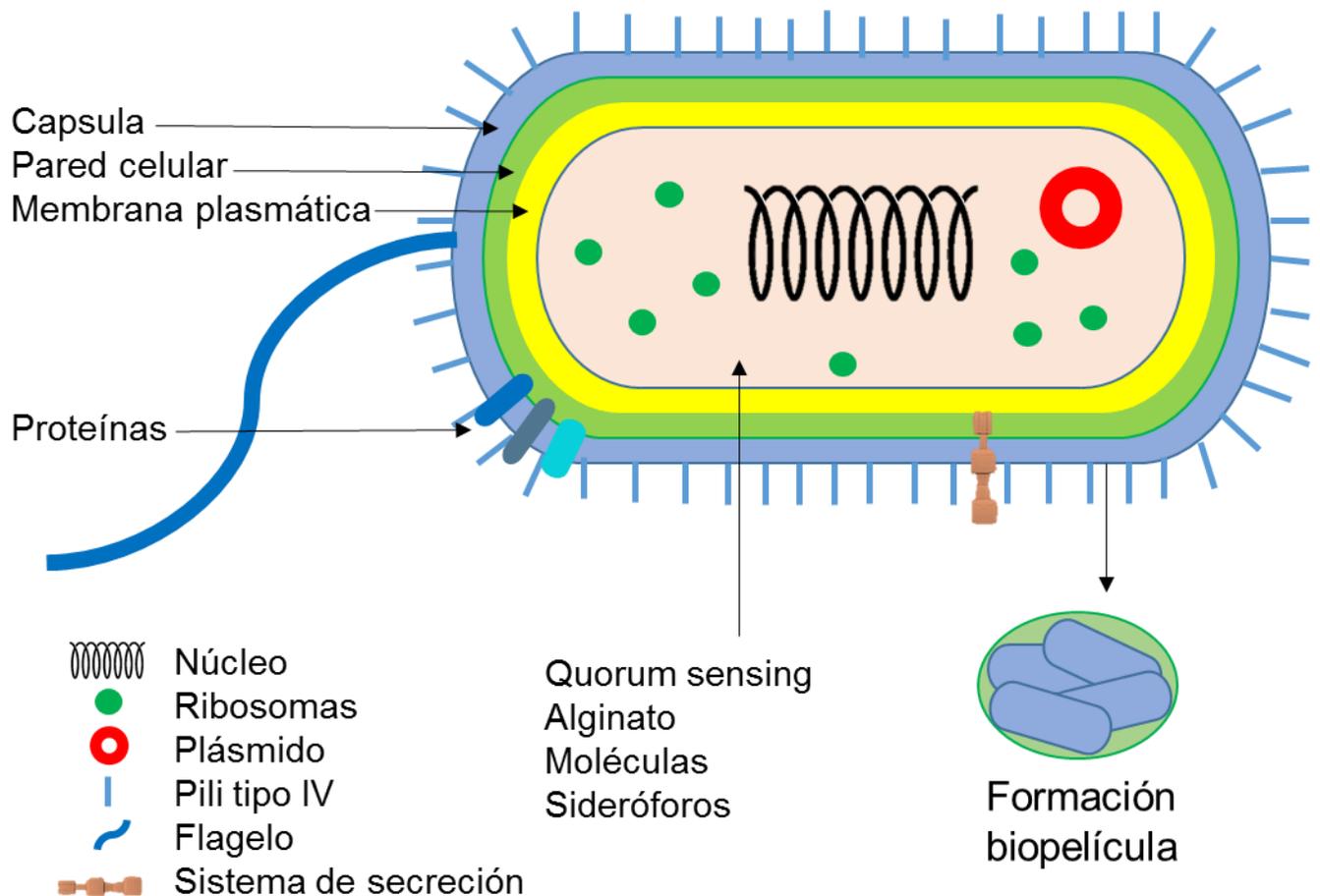


Figura 2. Factores de virulencia de *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* presenta diferentes factores que participan en la virulencia, como lo son, el flagelo, los pilis, el sistema de secreción, el alginate, el sideróforo, la formación de biopelículas y el Quorum sensing (modificado de Killough y col., 2022).

4.5 PLÁSMIDOS

Los plásmidos son moléculas de DNA cuyo tamaño va desde 1000 a 500000 pb. (Pinto y col., 2012; Zhou y col., 2012). Son elementos genéticos extracromosómicos circulares, aunque también se ha encontrado plásmidos lineales. Los plásmidos se pueden encontrar en casi todas las bacterias y arqueas (Hernández-Ramírez, 2019). Los

plásmidos pueden codificar de 1 a cientos de proteínas, sin embargo, rara vez codifican productos esenciales para el crecimiento celular como los ARN polimerasas o enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (khar, 1997). Los plásmidos pueden replicarse independientemente del DNA, no son de vital importancia para la vida celular pero los genes que contiene confieren condiciones de supervivencia para la bacteria.

Los plásmidos codifican características fenotípicas como lo es la resistencia a antibióticos (ampicilina, tetraciclina y kanamicina), la nodulación de raíces de leguminosas. La producción de antibióticos como la bacteriocina. confieren resistencia a metales pesados, además, estas moléculas de ADN poseen genes que codifican a enzimas que incrementan las habilidades nutricionales de la célula, mecanismos de reparación de DNA, transposones etc. (Bennett, 2007; Carattoli, 2011; Romero y Palacios, 1997; Thomas, 2000).

Los plásmidos no garantizan la supervivencia de la célula hospedera, sino que promueven la adaptación bacteriana, se encuentran en todas las comunidades bacterianas aisladas de suelos, aguas, hospitales etc. (Carattoli, 2011; Sorensen y col., 2005).

Los plásmidos se pueden clasificar de acuerdo al tipo de genes que poseen como: plásmidos de resistencia, los cuales poseen genes que confieren a la bacteria la capacidad para combatir algún veneno, antibiótico o metales pesados, plásmidos degradativos que poseen genes que codifican a sistemas que le permiten a la bacteria degradar sustancias inusuales de su entorno como la bacteria *Burkholderia xenovorans* que posee un plásmido degradativo que degrada compuestos sintéticos. Los plásmidos también pueden poseer genes que codifican a toxinas o a factores de virulencia que le

aportan a la batería mayor capacidad de causar daño a la célula huésped (Hernández-Ramírez, 2019).

4.6 SANGRE

La sangre es un tejido conectivo líquido por el que se comunican los tejidos del organismo, también se le conoce como tejido sanguíneo y proviene del mesénquima que es un tejido conformado por células indiferenciadas y pluripotentes. Se caracteriza por ser líquida, tiene un color rojo vivo al circular por las arterias y un color rojo oscuro al circular por las venas, esta coloración rojiza es debido a la presencia de hemoglobina en los eritrocitos; su densidad es dependiendo a la cantidad de eritrocitos, su presión osmótica y la cantidad de proteínas pero sus estimaciones van de 1040 a 1069 unidades, su pH va de entre 7.35-7.45, su viscosidad es 5 veces mayor a la del agua y posee un ligero sabor salado (Montalvo, 2019; Reiriz, 2015).

4.6.1 Funciones y composición de la sangre

Cuenta con tres funciones principales:

1. Transporte: la sangre transporta oxígeno de los pulmones a todas las células de cuerpo y dióxido de carbono de las células del cuerpo a los pulmones. También lleva a cabo el transporte de nutrientes y hormonas del tracto gastrointestinal a las células, también se encarga de transportar los desechos de los órganos para ser expulsados del cuerpo.
2. Regulación: la sangre mantiene la homeostasis de los líquidos del cuerpo. Regula el pH con sustancias amortiguadoras, apoya a el ajuste de la temperatura corporal por las propiedades de absorción de calor del agua en el plasma sanguíneo.



3. Protección: al recibir una lesión la sangre cuenta con una función de coagulación lo que previene la pérdida excesiva de sangre, además, previene de enfermedades por la acción de los glóbulos blancos que son transportador por la sangre (Tortora y Derrickson, 2006).

La sangre del cuerpo tiende a coagularse por lo que es necesario un anticoagulante como la heparina, citrato de sodio o de potasio, ácido etildiaminotetracético o EDTA, que al centrifugarse; se sedimentar en el fondo las células, también se forma una delicada capa blanca compuesta por leucocitos y plaquetas y en la parte superior de color amarillento el plasma que corresponde a un 55% de la muestra mientras que el 45% restante lo ocupan los eritrocitos (Montalvo, 2019; Reiriz, 2015).

El plasma está compuesto por un 90% de agua y el 10% restante se dividen en componentes inorgánicos compuesta por cationes como sodio, potasio, calcio, magnesio y aniones como cloruros, fosfatos, sulfatos y bicarbonato. Por otra parte, la sangre también se divide en componentes orgánicos compuesto por vitaminas, glucosa, lípidos, hormonas, aminoácidos y proteínas plasmáticas como la albumina. La albumina corresponde un 55% de las proteínas totales del plasma, sintetiza en el hígado y su función es trabajar como molécula transportadora de lípidos y hormonas en la sangre, es causante de la presión oncótica para la regulación del paso de agua y solutos por los capilares, además, también transporta bilirrubina, aminoácidos, hormonas, fármacos, etc. Otra de las proteínas que contiene la sangre es la globulina, que corresponde al 40% de las proteínas en el plasma, se dividen en α -globulinas, β -globulinas y γ -globulinas, siendo las dos primeras sintetizadas en el hígado y responsables del transporte de lípidos y vitaminas liposolubles en la sangre. Las γ -globulinas, además, son los anticuerpos que

le brindan protección al organismo de las infecciones. Y finalmente el 5% restante de las proteínas del plasma corresponden al fibrinógeno responsable de la coagulación de la sangre sintetizado por el hígado (Carmona, 2013; Reiriz, 2015).

4.7 SUERO SANGUÍNEO

El suero corresponde a la parte líquida de la sangre compuesto por agua con albumina, hormonas, vitaminas, oxígeno, nitrógeno, glucosa, grasa, minerales y dióxido de carbono (Carmona, 2013; Montalvo, 2019).

4.7.1 Efecto del suero sanguíneo en la virulencia en microorganismos

Se ha comprobado que el uso de suero sanguíneo aumenta la virulencia en diferentes microorganismos. Se ha estudiado que el uso de suero en el medio de cultivo, la bacteria *Staphylococcus aureus* aumenta la expresión de varios factores de virulencia en comparación con el medio de cultivo sin suplemento de suero, dichos factores corresponden a hemolisinas, enterotoxinas, proteasas y factores de adquisición de hierro (Oogai, 2011). Otro estudio realizado en el hongo *Mucor circinelloides* mostró el aumento en la virulencia de las esporas del hongo al adicionar al medio de cultivo YPG suero sanguíneo nativo, sugiriendo que esto se debe a que el suero sanguíneo nativo aumenta la interleuina-6 y la interleucina-1 β , que son proteínas inhibidoras de macrófagos-2 (Patiño y col., 2019).

4.8 GLUCOSA

Se le considera el monosacárido más abundante, está constituido por 6 átomos de carbono, aporta energía a las células por lo que es una molécula esencial para la vida. *P. aeruginosa* degrada a la glucosa mediante dos vías; una vía extracelular que lleva a cabo la oxidación de la glucosa a gluconato por la enzima glucosa deshidrogenasa, y la

vía intracelular donde se lleva a cabo la oxidación de la glucosa por la ruta metabólica Entner-Doudoroff (Rojas y col., 2006).

4.8.1 Efecto de la glucosa en la virulencia de microorganismos

La virulencia puede ser afectada por la concentración de glucosa en el medio de cultivo.

En *E. coli* 0157; H7 bajo concentración de glucosa en el medio de cultivo disminuye la expresión de genes. El establecimiento de una infección requiere la presencia y expresión de genes de virulencia (Me Kalanos, 1992). En *Listeria monocytogenes* la expresión de la listeriolisina O (una hemolisina que participa en la virulencia) se reduce a las concentraciones de glucosa ($>0 = a 0.3\%$) en el medio de cultivo. Sugiriendo que el efecto de la glucosa se debe a que induce un cambio en el pH del medio (Datta y Kothary, 1993). La concentración de glucosa en el medio también afecta la movilidad de las bacterias, en *Proteus mirabilis*, una enterobacteria asociada a interacciones entre humanos, 1% de glucosa en el medio disminuye el movimiento swarming. Algo similar fue reportado en *P. aeruginosa*, en donde la movilidad tipo swimming es dependiente de cambios en la concentración de glucosa del medio (Recuperado en Gotta y col., 2022).

En el 2016 se llevó a cabo un estudio en *Leishmania donovani* en la que se disminuyó la cantidad de glucosa adicionada al medio de cultivo lo que aumento la metaciclologénesis (proceso de transformar los promastigones de *Leishmania* en formas más infectivas capaces de sobrevivir en el huésped) y aumentó la virulencia por la autofagia mediada por la subunidad reguladora de la proteína cinasa A. La baja concentración de glucosa induce a la bacteria a entrar en un estado de estrés oxidativo dándole una mayor virulencia (Saini y col., 2016). Otro estudio realizado en *Entamoeba histolytica* menciona que la falta de glucosa aumenta la virulencia (Ayala, 2011).

4.9 SISTEMA TOXINA-ANTITOXINA (TA)

Los sistemas TA son muy abundantes en arqueas y bacterias, los sistemas TA confieren un sistema post-segregacional que interfiere con la proliferación de células libres de plásmidos. Los sistemas TA son codificados por un gen que codifica a una toxina estable y un gen que codifica una antitoxina inestable, los genes se encuentran formando un operón (Buts y col., 2005; Gerdes y col., 2005).

Los sistemas TA son localizados en plásmidos o cromosomas bacterianos y eliminan a células que no tienen plásmido. Aunado a esto se ha descrito que los sistemas TA inhiben procesos esenciales como la replicación, traducción, biosíntesis de ATP y la síntesis de pared celular (Jurénaité y col., 2013).

Algunas toxinas de los sistemas TA corresponden a proteínas que interrumpen procesos celulares esenciales para la proliferación; por el contrario, las antitoxinas son moléculas que pueden ser proteínas o ARN, que inhiben la actividad de la toxina (Buts y col., 2005; Gerdes y col., 2005). Además, se ha descrito la antitoxina bloquea la acción de la toxina siempre y cuando esté presente el plásmido en la célula, cuando se pierde el plásmido, la antitoxina se degrada y la toxina genera efectos tóxicos sobre funciones vitales las cuales pueden ser irreversibles o producir la muerte celular (Kasari y col., 2013).

4.9.1 Características generales de los sistemas TA

Los genes que codifican a la antitoxina suelen estar dispuestos de manera adyacente a los genes que codifican a la toxina. La proteína antitoxina impide la acción de la proteína antitoxina dándole estabilidad al sistema TA al perderse el operón o el plásmido que posee el operón TA, la antitoxina producida se degrada, ya que bioquímicamente es más inestable que la toxina, por acción de RNAsas o proteasas celulares. Por otra parte, la

proteína toxina es más estable bioquímicamente lo que le permite ejercer su efecto toxico en ausencia de la antitoxina, atenuando sobre la diana celular, generando virulencia y ocasionando la muerte de la célula. Las toxinas pueden alterar diferentes funciones celulares como la traducción, replicación, formación del citoesqueleto, integridad de la membrana y biosíntesis de la pared celular (Buts y col., 2005; Van Melderen y Saavedra De Bast 2009) (Figura 3).

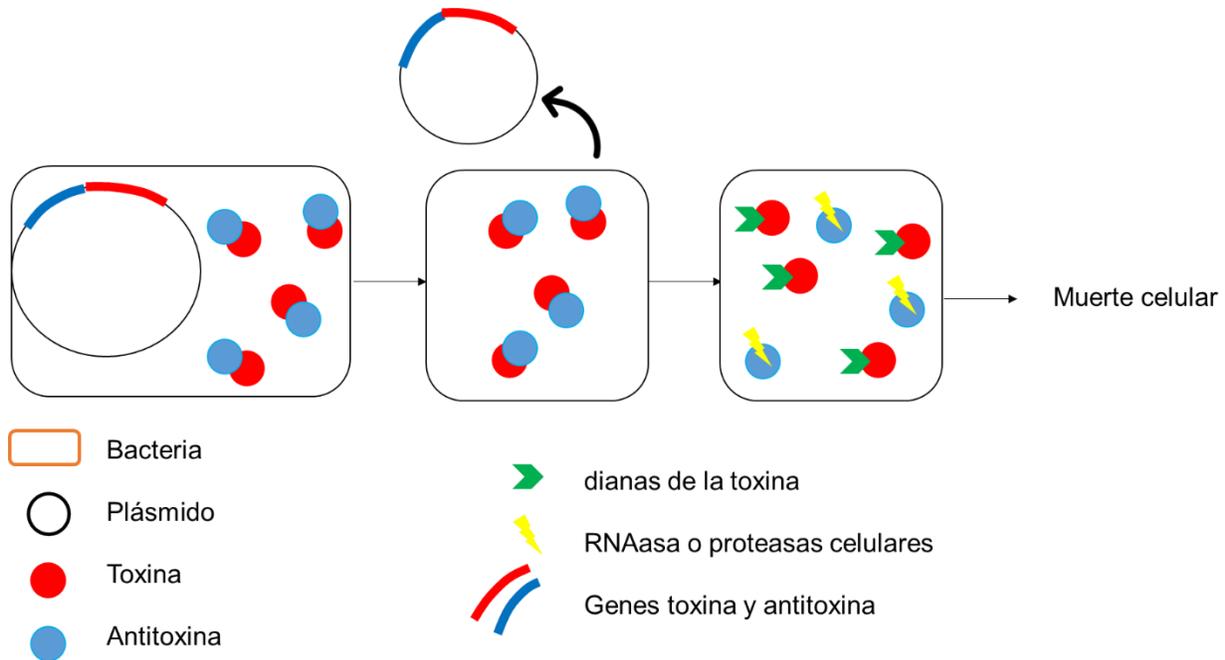


Figura 3. Esquema del funcionamiento del sistema toxina-antitoxina TA.

Representación de una bacteria con plásmido que posee un sistema TA, el plásmido codifica a la antitoxina que bloqueando a la toxina. La pérdida del plásmido inactiva la síntesis nueva antitoxina y la antitoxina almacenada es degradada por RNAsas o proteasas celulares permitiendo que la toxina ejerza efectos tóxicos provocando la muerte celular. (modificado de Lobato, 2015).

5. ANTECEDENTES

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa considerada una de las principales bacterias causantes de infecciones oportunistas en humanos, puede llegar a infectar desde humanos a plantas, se ha observado que los determinantes de la virulencia de *P. aeruginosa* son codificados en el genoma y que estos pueden variar entre los distintos tipos de cepas por genes adicionales codificados en plásmidos e islas genómicas (Ramírez-Díaz y col., 2011).

El plásmido pUM505 (Figura 4). Se aisló por primera vez de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado en Morelia, Michoacán, México. Posee un tamaño de 123,322 pares de bases (pb), contiene 138 regiones codificantes, de los cuales 64 codifican a proteínas, 15 codifican a elementos móviles, 13 se relacionan con la transferencia, 13 poseen resistencia a metales, 13 codifican al metabolismo y 5 se relacionan en la regulación transcripcional (Ramírez-Díaz y col., 2011).

Además, el plásmido pUM505 posee una región conocida como isla de patogenicidad (PAI) con 67 kb, y una región de resistencia a metales con 31 kb. La isla de patogenicidad posee 78 marcos de lectura abierto de los cuales 64 de ellos se encuentran en las PAIs PAPI-1 y PAPI-2 del cromosoma de la cepa de *P. aeruginosa* PA14, un aislado clínico altamente virulento (He y col., 2004).

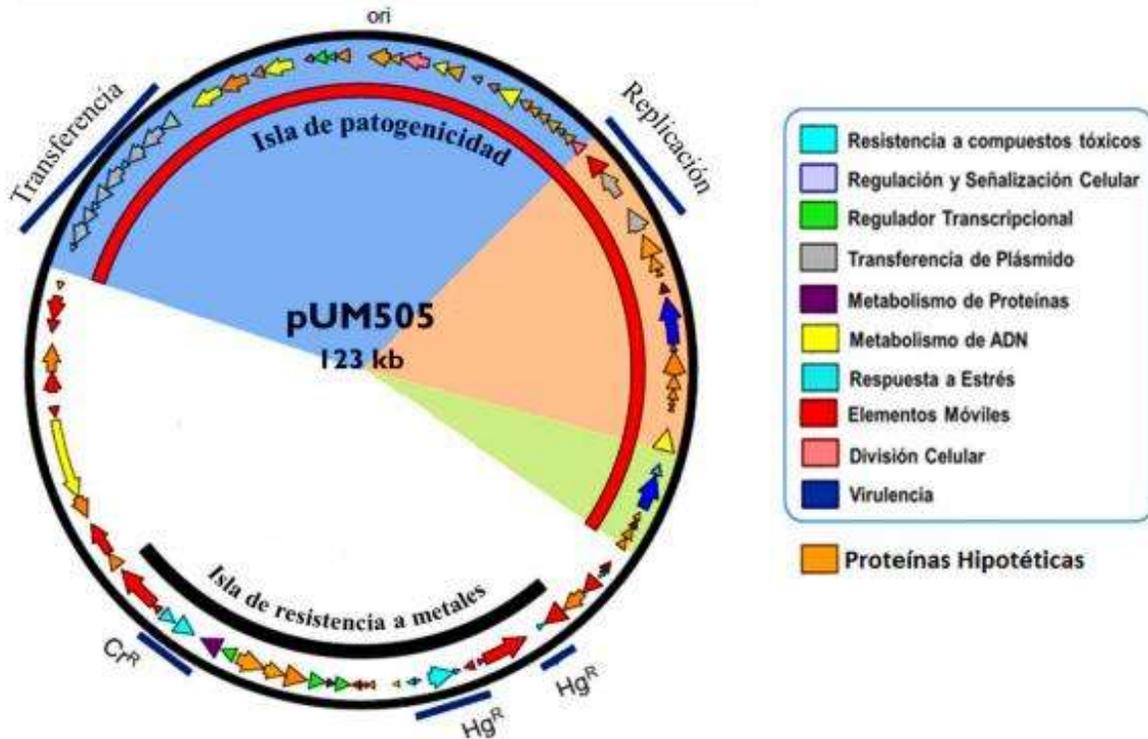


Figura 4. Esquema del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Las regiones marcadas con flechas o puntas de flechas indican el sentido de la transcripción. Representadas en el cuadro se encuentra las proteínas codificadas con sus posibles funciones. La barra roja corresponde a la isla de patogenicidad (PAI) la cual se encuentra dividida en forma de mosaico de color azul, naranja y verde. La barra negra corresponde a la isla de resistencia a metales. Se muestra el origen de la replicación *ori* y los genes correspondientes a la transferencia conjugativa y replicación. Se muestra los genes relacionados con la resistencia a mercurio (Hg^R) y a cromato (Cr^R) (Modificada de Ramírez-Díaz y col., 2011).

Realizando ensayos en modelo de virulencia en hojas de lechuga la presencia se determinó que la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 se incrementa al tener el plásmido pUM505 (Figura. 4) (Rodríguez-Andrade y col., 2015).

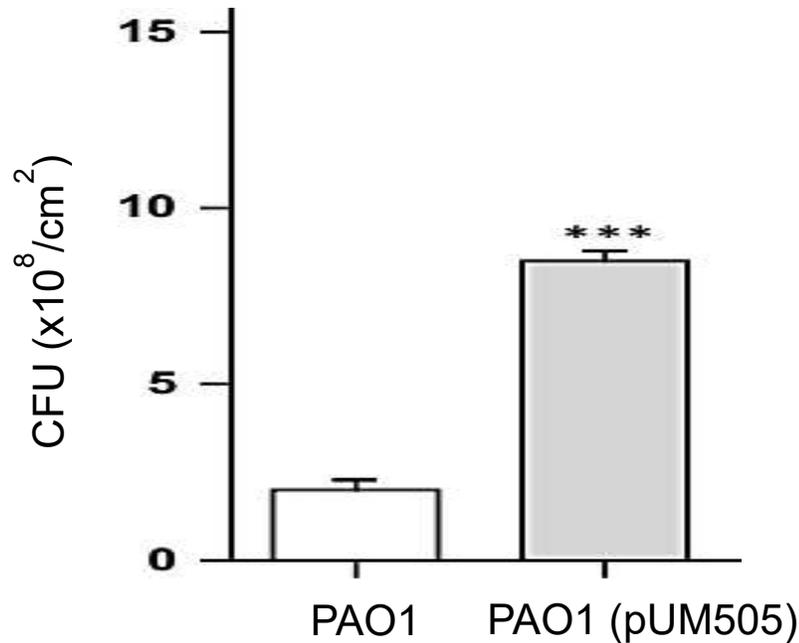


Figura 5. Efecto de la virulencia del plásmido pUM505 en *P. aeruginosa* PAO1 en el modelo de infección en hojas de lechuga. Los datos corresponden a seis experimentos diferentes con desviación estándar (DE). El análisis de varianza con relación al control PAO1 se indican por **** $P < 0.001$ (Prueba de Tukey) (modificado de Magaña, 2022).

El plásmido pUM505 además de poseer genes que codifican a mecanismos de resistencia a metales, posee genes que codifican a un sistema toxina-antitoxina TA. El sistema TA, codificado en el plásmido pUM505 confiere estabilidad al plásmido, además, la toxina codificada por el sistema TA incrementa la virulencia de la bacteria (Hernández-Ramírez y col., 2017). El sistema toxina-antitoxina PumAB del plásmido pUM505 es codificado los *orf* (Open Reading Frames) 123 y 124 (Fig.5) (Hernández-Ramírez y col., 2017). El *orf* 123 codifica a la toxina PumA y el *orf* 124 codifica a la antitoxina PumB, la toxina PumA es la responsable de aumentar la virulencia y es neutralizada por la

antitoxina PumB (Figura 6). Se comprobó que la virulencia conferida por la toxina PumA está regulada por el sistema de Quorum Sensing (QS), ya que al ser transferido el *orf* 123 a la cepa *P. aeruginosa lasI/rhlI*, la cual es una mutante del sistema *LasI* y *RhlI* de QS, la bacteria mostró virulencia, sugiriendo que la toxina renombrada como PumA es modulado por QS (Hernández-Ramírez y col., 2020). La suplementación química de la mutación en el QS por la adición de los autoinductores C4-AHL y 3-oxoC12-AHL en el medio de crecimiento de *P. aeruginosa lasI/rhlI* (pUC_pumA) restableciendo la virulencia de la bacteria, comprobando que el QS regula la virulencia conferida por la toxina PumA (Hernández-Ramírez y col., 2020).

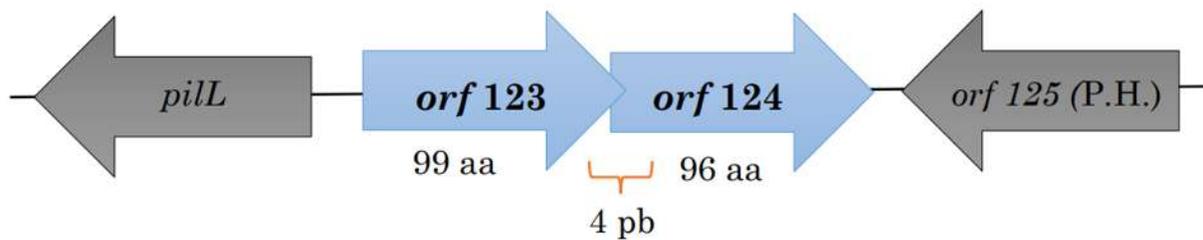


Figura 6. Sistema TA del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Las flechas azules corresponden a los genes *pumA* (*orf123*) y *pumB* (*orf124*), traslapados por 4 pares de bases. Se indica el tamaño en aminoácido (aa) de la toxina y la antitoxina. Representado en gris los genes colindantes del operón *pumAB* (Obtenida de Hernández-Ramírez, 2015).

Adicionalmente se determinó que la toxina PumA del sistema Toxina-Antitoxina aumenta la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1. En modelo de ratón se observa un incremento en las unidades formadoras de colonia de la bacteria con el *orf* 123 en los tejidos del ratón

correspondientes a corazón, pulmón y riñón, con respecto a los tejidos infectados con la bacteria sin el gen (Hernández-Ramírez, 2015).

La adición de 10% y 20% de suero sanguíneo a cultivos de la cepa de *P. aeruginosa* pUM505 disminuye la virulencia de la bacteria sobre nematodos, sugiriendo que el suero regula negativamente los factores de virulencia codificados en el plásmido pUM505 (Magaña, 2022). Además, el cultivo de la cepa de *P. aeruginosa* que posee el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB* suplementado con 10% de suero, mostraron un incremento en la virulencia en *C. elegans* (Figura.7) en comparación a los cultivos sin suero, sugiriendo que el suero tiene un efecto positivo en la virulencia conferida por la toxina PumA, pero negativo en la antitoxina PumB (Magaña, 2022).

Si bien estos antecedentes mostraron que la virulencia codificada por genes del plásmido pUM505 puede ser modulada por el suero sanguíneo, no se evaluó si en general la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, fondo genético en el que el plásmido pUM505 está presente, también se modula por el suero

Sin embargo, los estudios previamente descritos no evaluaron el efecto de suero en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, cepa que fue empleada como fondo genético para la recepción y estudio del plásmido pUM505 y de los genes *pumA*, *pumB* y *pumAB*.

Además, como se describió en la introducción la concentración de glucosa en el medio de cultivo afecta la expresión de genes de virulencia y de otros factores como el movimiento swarming que también es importante para la virulencia. Por lo que es de interés evaluar el efecto del suero sanguíneo en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, así como determinar si hay cambios en la concentración de glucosa, modifican la

virulencia conferida por el plásmido pUM505 y los genes *pumA*, *pumB* y *pumAB* en ausencia y presencia de suero.

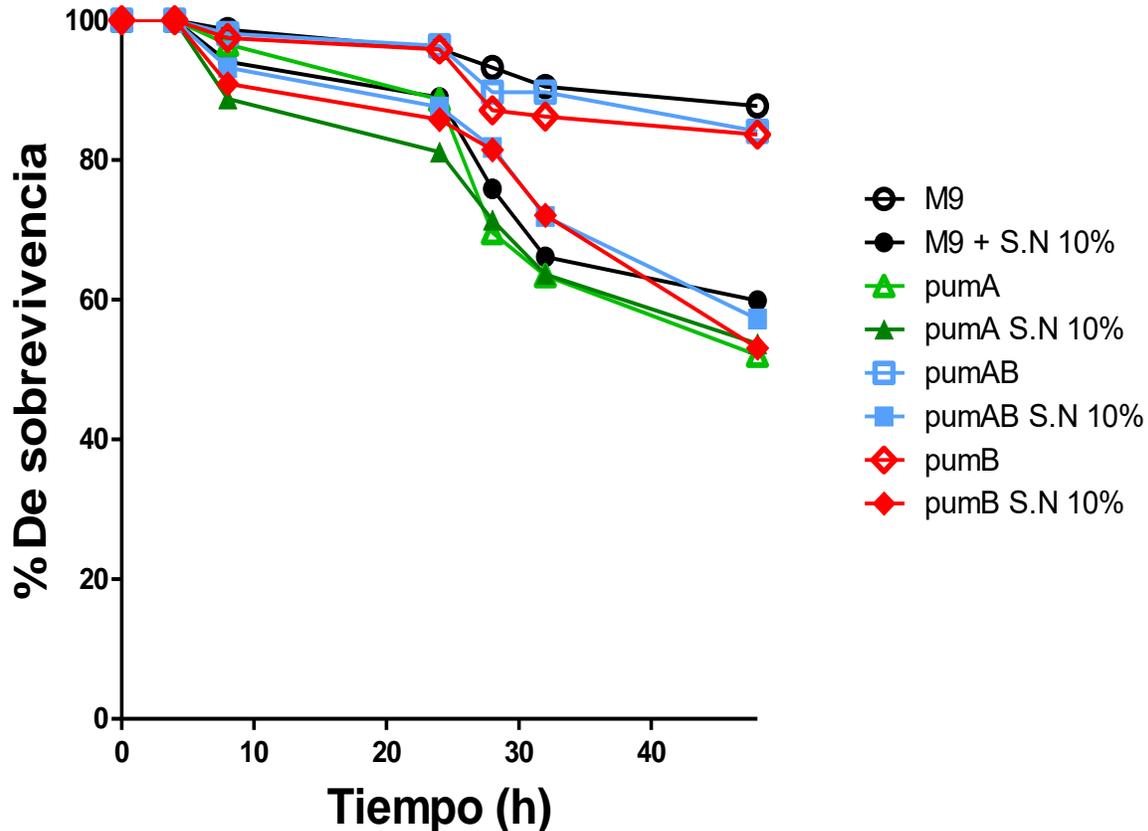


Figura 7. Efecto de la adición de suero sanguíneo en la virulencia conferida por los genes del sistema toxina-antitoxina PumAB de pUM505. Grupos de 20 nematodos fueron incubados con 1×10^5 ($\pm 1 \times 10^4$ UFC de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas en ausencia o presencia 10% de suero sanguíneo nativo (S.N). (Magaña, 2022).

6. JUSTIFICACIÓN

P. aeruginosa es una bacteria patógeno oportunista que es fuente de infecciones en humanos. El plásmido pUM505 contribuye con virulencia de *P. aeruginosa*. 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. Por lo que es de interés evaluar el efecto del suero sanguíneo en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, así como determinar si los cambios en la concentración de glucosa, modifican la virulencia conferida por el plásmido pUM505 o a los genes *pumA*, *pumB* y *pumAB* en ausencia y presencia de suero.

7. HIPOTESIS

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

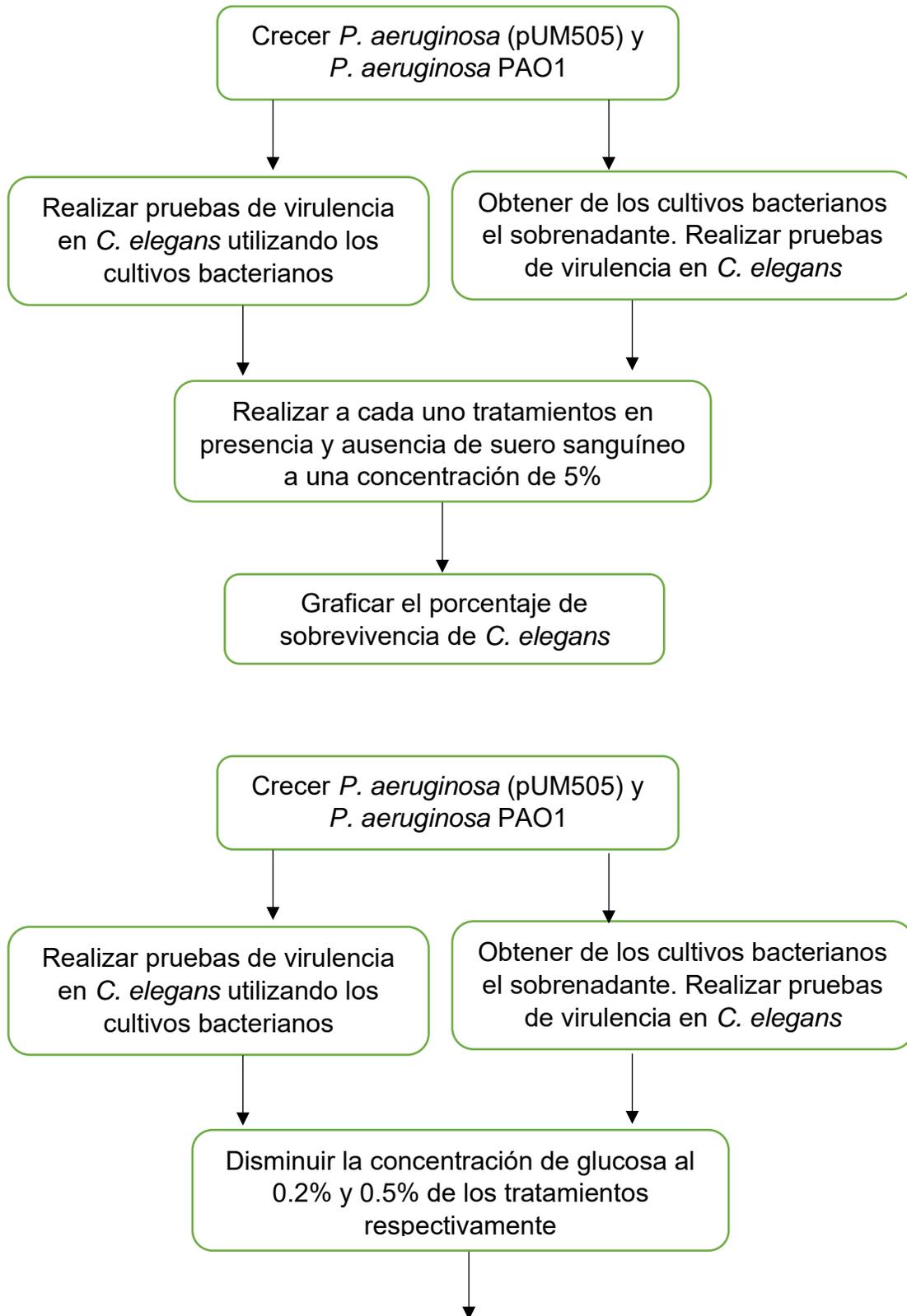
8. OBJETIVO GENERAL

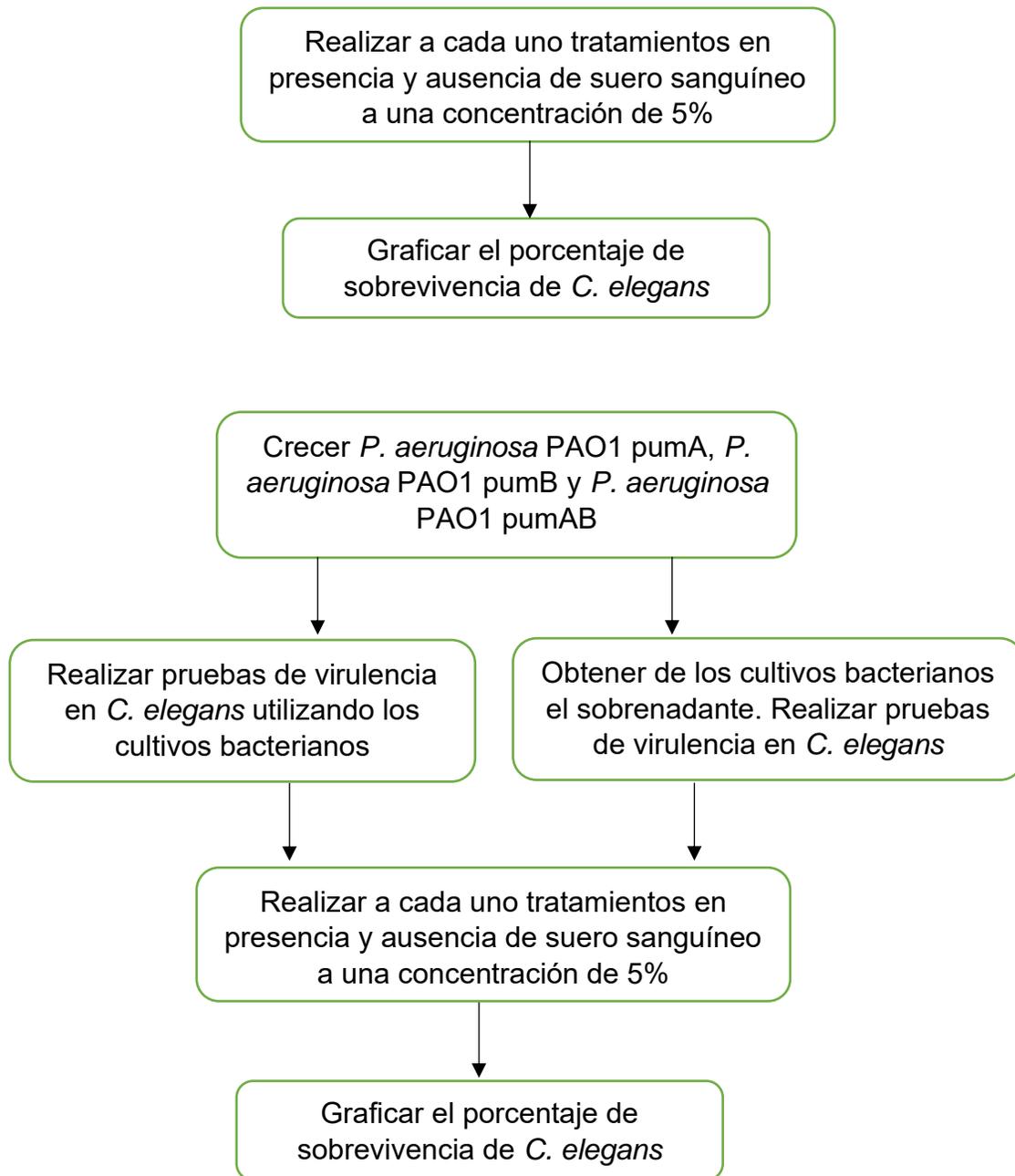
Determinar los cambios en la concentración de glucosa del medio, así como la presencia de suero aumentan la virulencia conferida por el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*.

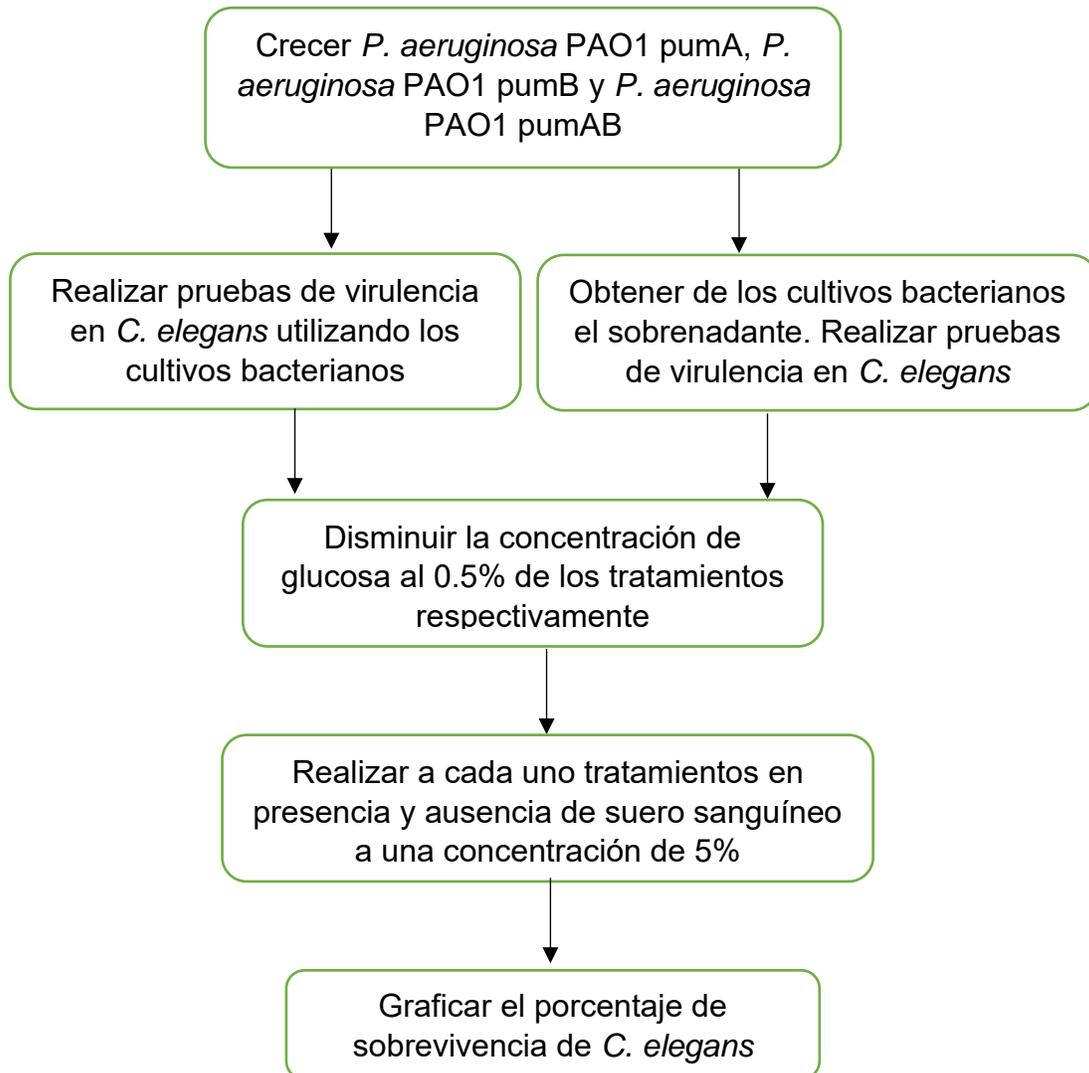
9. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar el efecto del suero sanguíneo en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1.
2. Determinar el efecto del del cambio de concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre la virulencia de las cepas.
3. Analizar el efecto de la glucosa sobre los niveles de virulencia conferida por las bacterias crecidas en presencia o ausencia de suero sanguíneo.

10. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL







11. MATERIALES Y MÉTODOS

11.1 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 μL de colesterol.

11.2 Cepas

- a) *P. aeruginosa* PAO1 (Colección de la Dra. Iglewski's) (Lil *et al*, 2007) esta cepa no contiene plásmidos, es sensible a rifampicina y estreptomina 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.
- 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 operón *pumAB* clonado en el vector pUCP20 (Hernández-Ramírez y col., 2017).

11.3 Suero

El suero sanguíneo utilizado fue donado por el centro estatal de transfusión sanguínea del estado de Michoacán y obtenido de hombres sanos de 20 y 30 años de edad.

11.4 Glucosa

BDBioxon.

11.5 Cultivos celulares

Los cultivos bacterianos de las cepas *P. aeruginosa* se crecieron en medio M9 a 37°C de 18 a 22 horas, preparado con diferentes concentraciones de glucosa y suplementado o no con suero nativo diferente (con concentraciones de glucosa).

11.6 Obtención de extractos libres de células

Los cultivos bacterianos de las cepas *P. aeruginosa* crecidos en medio M9 en presencia y ausencia de suero nativo a 37°C de 18 a 22 horas, y fueron centrifugados por 5 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante fue transferido en un tubo eppendorf limpio y fue empleado en ensayos posteriores.

11.7 Virulencia en el modelo de nematodo *Caenorhabditis elegans*

Previamente se crecieron preinóculos de las cepas de interés, en medio M9 a 37°C toda la noche. Los nematodos *C. elegans* se crecieron durante 5-6 días, en una placa con medio NGM (medio de crecimiento de nematodos) hasta conseguir la edad adulta, a 18°C para realizar el ensayo de virulencia en una placa de 96 pozos, se colocó 1.5 µL (correspondiente a una concentración de $1 \times 10^6 (\pm 1 \times 10^4)$ UFC) de las cepas de interés y se llevó a un volumen final de 200 µL con medio M9, en esterilidad se adicionó 18-20 nematodos por pocillo y se incubó 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 finalizar se graficó el porcentaje de sobrevivencia contra el tiempo en que fueron observados los nematodos.

Para los ensayos con sobrenadante de los cultivos bacterianos, los nematodos fueron incubados con 150 μ l del sobrenadante bacteriano resuspendido previamente en medio M9 en un volumen total de 1 ml. El sobrenadante empleado fue obtenido de un cultivo con una concentración de 1×10^6 ($\pm 1 \times 10^4$) UFC posteriormente las placas de los nematodos con el sobrenadante fueron incubados a 18°C determinando el % de nematodos vivos cada 6 horas. Los ensayos fueron realizados con una N de 2 por duplicado.

12. RESULTADOS

12.1 Efecto del suero sanguíneo en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1

Como se describió en antecedentes, la adición de suero sanguíneo afecta la virulencia conferida por el plásmido pUM505, sin embargo, no se analiza el efecto del suero en la virulencia de la cepa *P. aeruginosa* PAO1, que además de servir como receptor del plásmido pUM505, posee virulencia a diferentes hospederos.

Por tanto, se evaluó el efecto de la adición de suero sanguíneo en la virulencia, empleando ensayos de virulencia con el *C. elegans*. Los resultados mostraron que la adición de suero al medio de cultivo del crecimiento de la bacteria genero una ligera disminución en la sobrevivencia de los nematodos a las 24 y 30 horas del ensayo, sugiriendo un aumento en la virulencia de la bacteria por la presencia del suero (Figura 8). Los resultados observados son similares a los obtenidos para la cepa de *P. aeruginosa* pUM505, donde como era de esperarse el suero aumento la virulencia.

Este dato sugiere que los genes de virulencia codificados en el cromosoma de *P. aeruginosa* PAO1 también son modulados por moléculas presentes en el suero.

12.2 Efecto del sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 crecido en presencia de suero sanguíneo en la virulencia

Para conocer el efecto del sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 en la virulencia, se llevaron a cabo ensayos en *C. elegans* utilizando los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505, para lo cual los cultivos creados previamente fueron centrifugados y filtrados para obtener el sobrenadante libre de células. Los resultados mostraron que la incubación de los nematodos con el sobrenadante del cultivo de *P. Aeruginosa* PAO1 disminuyendo ligeramente la sobrevivencia de los nematodos a las 24 y 30 horas del ensayo (Figura 9), sugiriendo un aumento de la virulencia del

sobrenadante. Este efecto no fue observado en el caso del sobrenadante de *P. aeruginosa* pUM505, el cual genero el mismo nivel de sobrevivencia de los nematodos. Estos datos sugieren que los factores de virulencia codificados en el cromosoma de *P. aeruginosa* PAO1 que son secretados pueden ser modulados por el suero sanguíneo.

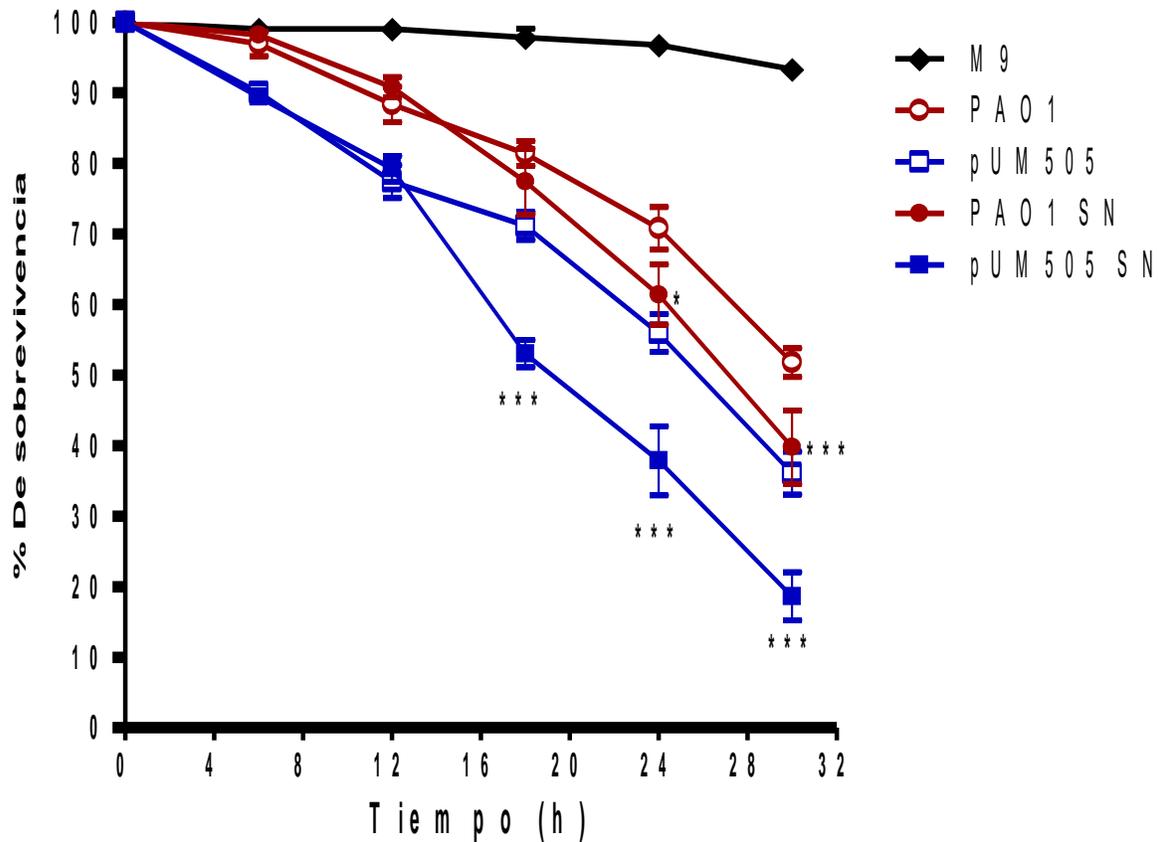


Figura 8. Efecto del suero nativo en la virulencia. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con 1×10^5 ($\pm 1 \times 10^4$) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505, crecidas previamente en presencia y ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN). La mezcla de nematodos y UFC se incubaron a 19°C, para posteriormente determinar la cantidad de nematodos vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

Los datos corresponden a un análisis de varianza ANOVA bidireccional, *** es $P < 0.001$ y * es $P < 0.05$.

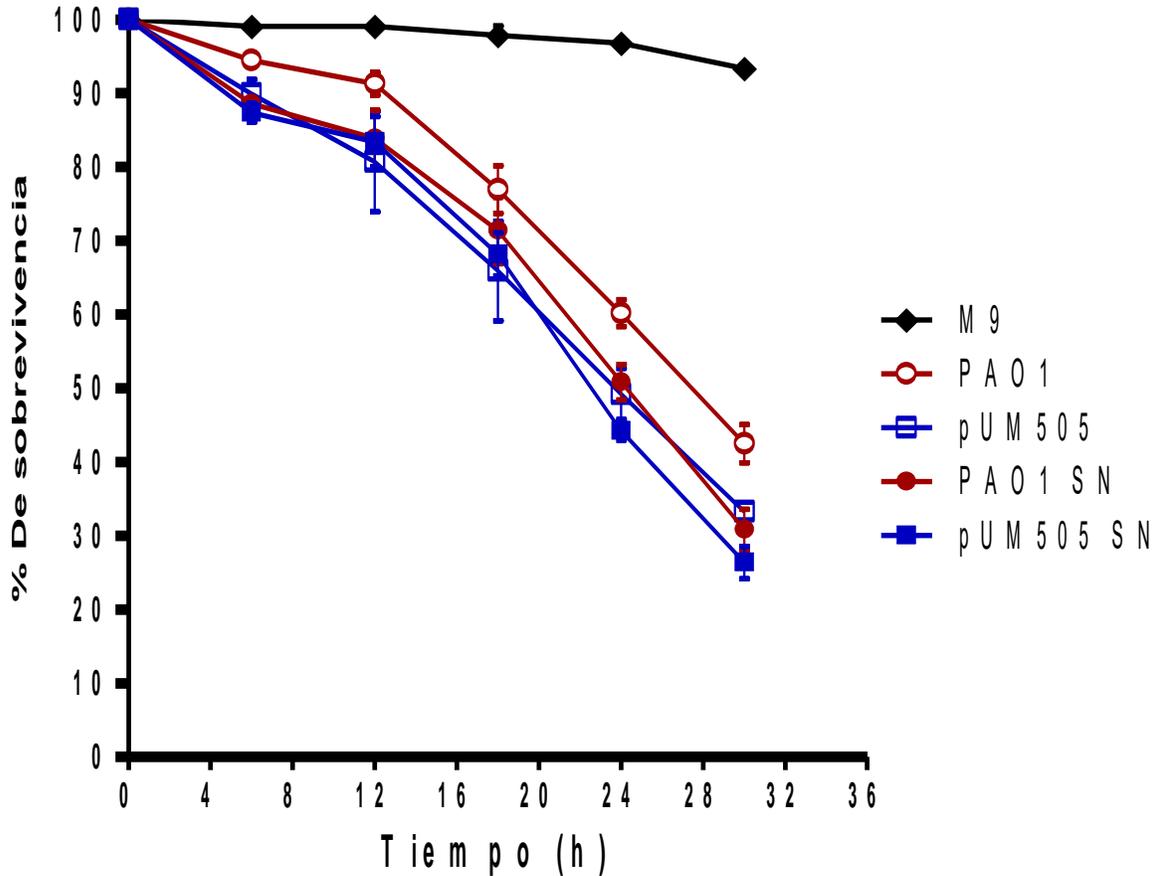


Figura 9. Efecto del sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* crecidas en presencia de suero en la virulencia. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con el sobrenadante de 1×10^5 ($\pm 1 \times 10^4$) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 o *P. aeruginosa* pUM505, crecidas anteriormente en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN) Los nematodos se incubaron a 19°C, para posteriormente determinar la cantidad de nematodos vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.



12.3 Efecto de la adición de suero sanguíneo en la virulencia conferida por genes del plásmido pUM505 en crecimiento con alta concentración de glucosa.

El medio de cultivo empleado para los ensayos de virulencia M9, es un medio mínimo que contiene 2% de glucosa como fuente de carbono. Con el propósito de evaluar el efecto de cambios en la concentración de glucosa sobre el efecto generado por el suero al 5% en la virulencia de las bacterias, primeramente, se realizaron ensayos de virulencia de diversas cepas de *P. aeruginosa* empleando el medio M9 con concentración estándar de glucosa para el crecimiento bacteriano.

Se evaluó la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* pumAB, *P. aeruginosa* pumA y *P. aeruginosa* pumB, los cuales poseen a los genes *pumA* y *pumB*, respectivamente quienes codifican a proteínas del sistema toxina-antitoxina PumAB, previamente relacionado con la virulencia (Hernández-Ramírez y col., 2017).

Los resultados mostraron como se esperaba que la sobrevivencia de los nematodos disminuyó hasta aproximadamente el 15% en presencia de *P. aeruginosa* pumA (Figura 9). Sin embargo, los resultados mostraron que la adición de suero nativo al 5% en el medio M9 no modificó la virulencia de la bacteria (Figura 10). Contrario a lo observado para los nematodos incubados con las UFC de *P. aeruginosa* pumB o *P. aeruginosa* pumAB, donde el suero induce a un crecimiento de la virulencia (Figura 10).

12.4 Efecto del sobrenadante de *P. aeruginosa* pumAB, *P. aeruginosa* pumA y *P. aeruginosa* pumB crecidos en presencia de suero nativo en la concentración

Se realizaron ensayos de virulencia utilizando el sobrenadante de *P. aeruginosa* pumA, *P. aeruginosa* pumB y *P. aeruginosa* pumAB crecidos nuevamente en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo. Los resultados mostraron una disminución en la sobrevivencia del nematodo *C. elegans* al ser incubados con el sobrenadante de las cepas

de *P. aeruginosa* pumAB y *P. aeruginosa* pumB de cultivos crecidos en presencia de suero sanguíneo nativo (figura 11). Estos datos confirman que el suero regula la virulencia de factores de virulencia como el sistema toxina-antitoxina PumAB que son codificados por el plásmido pUM505.

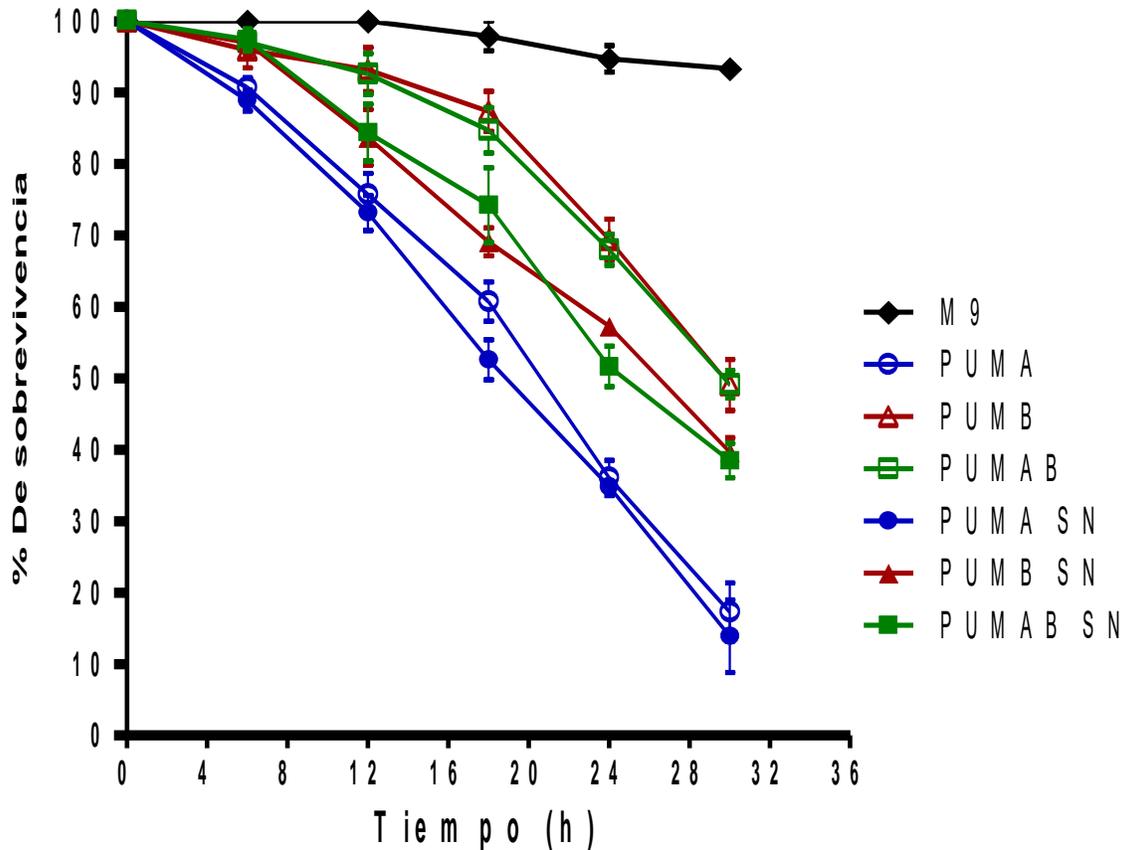


Figura 10. Efecto del suero nativo en la virulencia conferida por el sistema toxina-antitoxina PumAB del plásmido pUM505. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con 1×10^5 ($\pm 1 \times 10^4$) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, respectivamente, crecidas previamente en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN). Los nematodos se incubaron a 19°C, posteriormente se determinó la cantidad de

nematodos vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

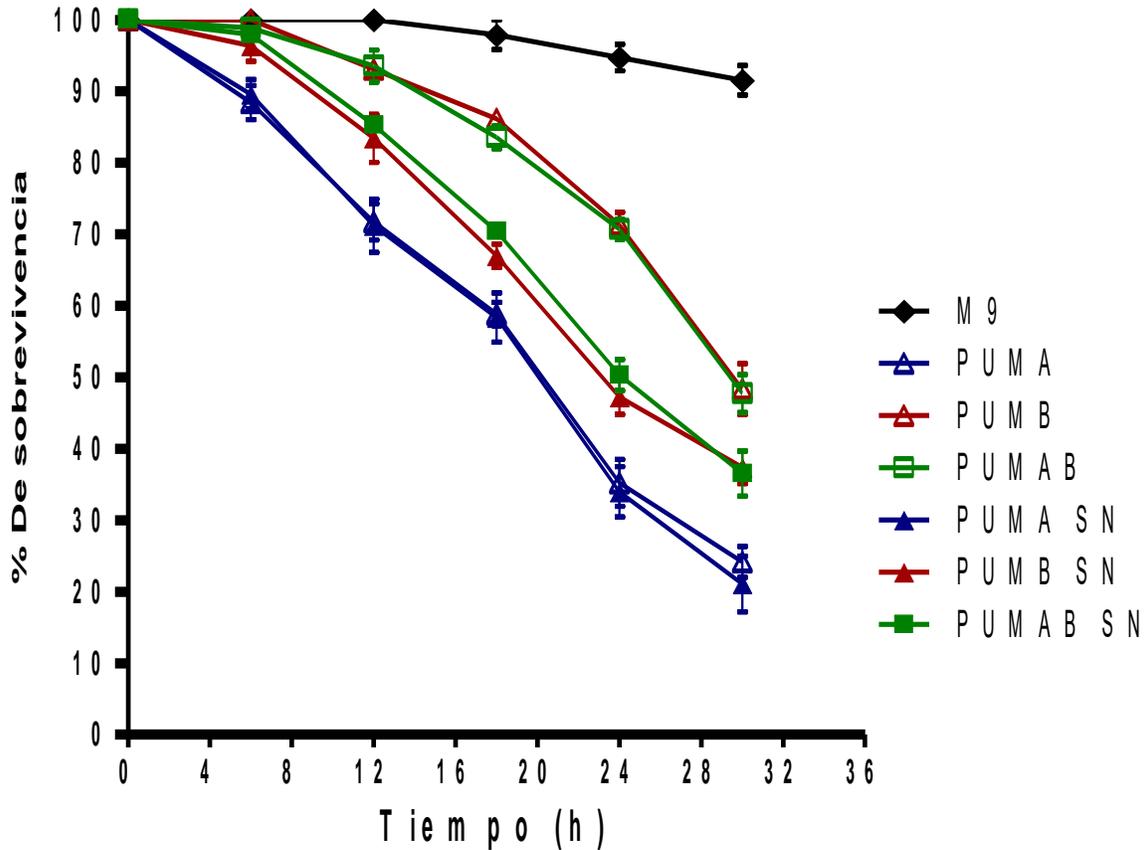


Figura 11. Efecto del sobrenadante de cultivos creados en presencia de suero nativo en la virulencia conferida por el sistema toxina-antitoxina PumAB del plásmido pUM505. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con el sobrenadante obtenido de $1 \times 10^5 (\pm 1 \times 10^4)$ Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen los genes *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas previamente en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN). Los nematodos se incubaron a 19°C, posteriormente se determinó la cantidad de nematodos

vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

12.5 Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo

Con el propósito de evaluar, el efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre el efecto del suero en la regulación de la virulencia bacteriana se realizaron ensayos de virulencia empleando cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505, crecidos en medio M9 suplementado con 0.5% de glucosa y en presencia o ausencia de suero sanguíneo. Los resultados mostraron que en ambas cepas el crecimiento en M9 al 0.5% de glucosa (Figura 12). Genero mayor virulencia la adición del suero sanguíneo nativo. La sobrevivencia del nematodo *C. elegans* incubado con *P. aeruginosa* pUM505 crecidas en suero sanguíneo en la virulencia del cultivo crecido en presencia de suero sanguíneo llego al 0% en comparación con la cepa que no fue crecida con suero sanguíneo nativo que tuvo una sobrevivencia del 20%. Los resultados obtenidos para la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 crecido en M9 con 0.5% de glucosa, de igual manera mostro un aumento en la virulencia del cultivo crecido en presencia de suero sanguíneo en donde la sobrevivencia de los nematodos paso de 70% a 50% al final del ensayo (Figura 12). Estos datos indicaron que la concentración de glucosa en el medio de cultivo altera el efecto del suero sanguíneo en la virulencia de la bacteria.

12.6 Efecto del sobrenadante de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo

Se realizaron ensayos de virulencia utilizando los sobrenadantes de las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505 de cultivos en M9 suplementados con 0.5%

de glucosa y crecidos en presencia o ausencia de suero sanguíneo. Los resultados obtenidos mostraron que los nematodos incubados en presencia de los sobrenadantes provenientes de los cultivos suplementados con suero sanguíneo fueron más virulentos que los sobrenadantes de cultivos sin suero (Figura 13). Además, los resultados mostraron que la disminución de la concentración de glucosa en el medio M9 claramente mejoro la virulencia de los sobrenadantes, en comparación con la virulencia de los sobrenadantes obtenidos de cultivos de M9 con 2% de glucosa (Figura 9 y 13).

El crecimiento de las bacterias en medio M9 con 0.5% de glucosa aumento el efecto del suero sanguíneo sobre la virulencia de las cepas, el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 proveniente de cultivos crecidos con suero sanguíneo, disminuyendo la sobrevivencia de los nematodos hasta aproximadamente 40% en comparación de la virulencia de los sobrenadantes del cultivo sin suero que fue de aproximadamente 65% (Figura 13). Resultados similares se observaron en el sobrenadante de *P. aeruginosa* pUM505 provenientes de los cultivos crecidos con suero sanguíneo que generan una sobrevivencia de 0% en comparación con la virulencia de los nematodos con sobrenadantes del cultivo sin suero que fue de 8% (Figura 13). Estos datos indican que la concentración de glucosa en general tiene un efecto en la virulencia de las bacterias.

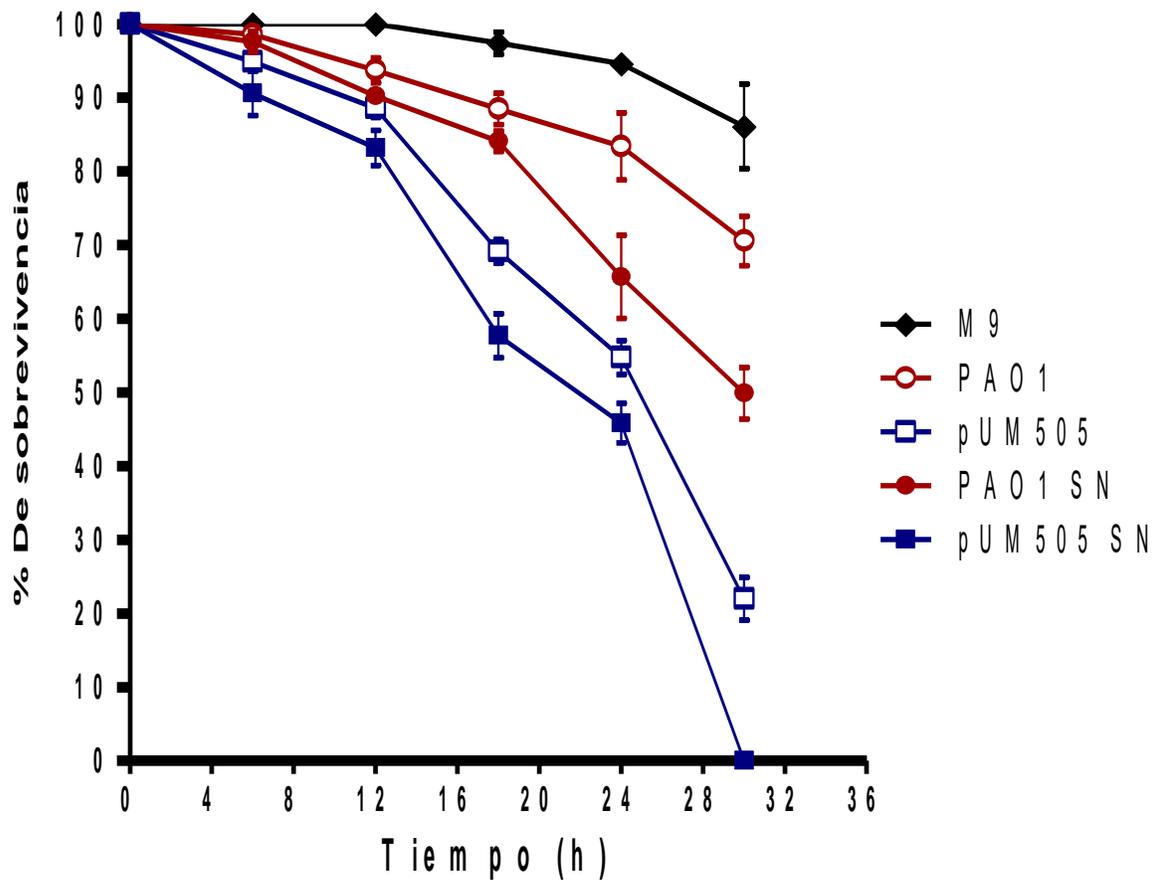


Figura 12. Efecto de la glucosa al 0.5% en la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* crecidas en presencia o ausencia de suero sanguíneo. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con 1×10^5 ($\pm 1 \times 10^4$) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505, crecidas previamente en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN) en medio M9 con una concentración de glucosa al 0.5%. Los nematodos fueron incubados a 19°C, posteriormente se determinó la cantidad de nematodos vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

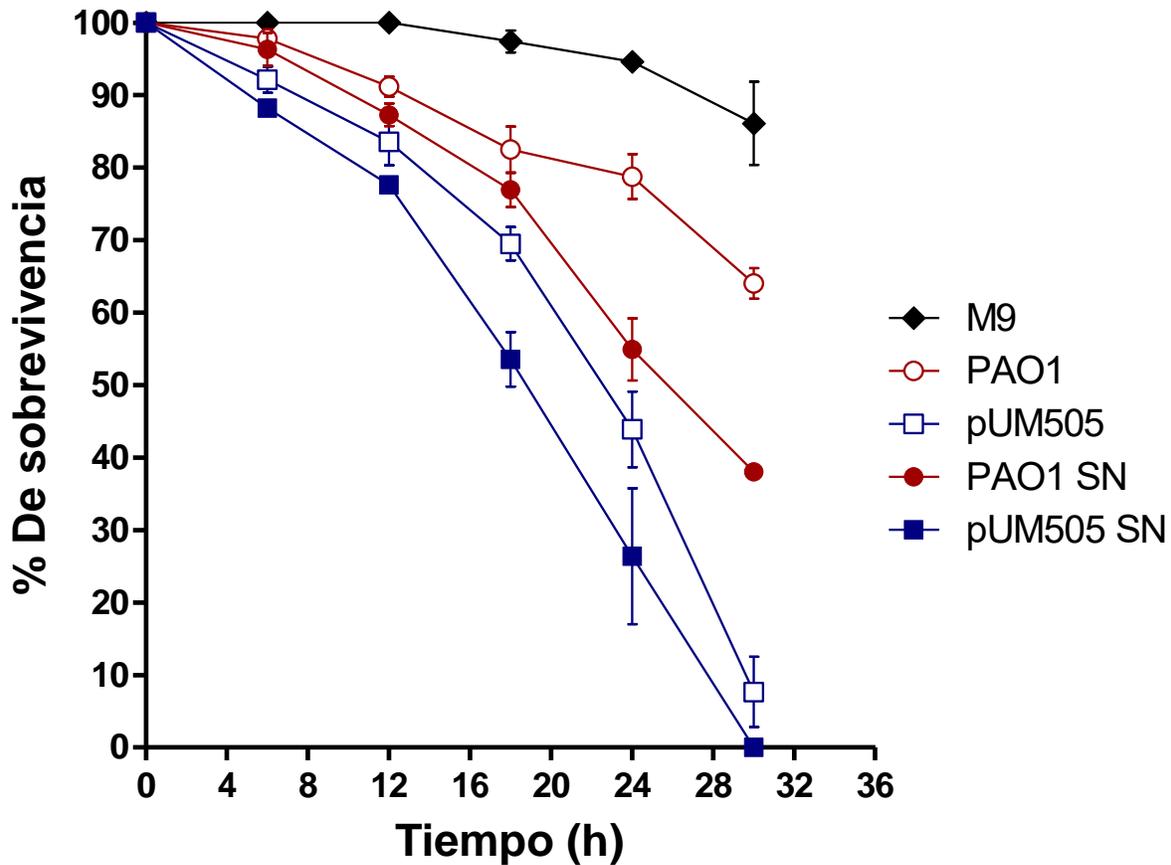


Figura 13. Efecto de la glucosa al 0.5% en la virulencia de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa*. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con sobrenadante obtenido de cultivos de M9 con 0.5% de glucosa con 1×10^5 ($\pm 1 \times 10^4$) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505, crecidas previamente en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN). Los nematodos se incubaron a 19°C, para posteriormente determinar la cantidad de nematodos vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

12.7 Efecto de una menor concentración de glucosa al en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo

Nuevamente, con el propósito de evaluar el efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo sobre el efecto del suero en la regulación de la virulencia bacteriana se realizaron ensayos de virulencia empleando cultivos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505, crecidos en medio M9 suplementado con 0.2% de glucosa y en presencia o ausencia de suero sanguíneo. Los resultados mostraron que en ambas cepas el crecimiento en M9 al 0.2% de glucosa (Figura 14). Generando mayor virulencia la adición del suero sanguíneo nativo. La sobrevivencia del nematodo *C. elegans* incubado con *P. aeruginosa* pUM505 crecidas en suero sanguíneo en la virulencia del cultivo crecido en presencia de suero sanguíneo llego al 28% en comparación con la cepa que no fue crecida con suero sanguíneo nativo que tuvo una sobrevivencia del 40% en un lapso de tiempo de 24horas. Los resultados obtenidos para la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 crecido en M9 con 0.2% de glucosa, de igual manera mostro un aumento en la virulencia del cultivo crecido en presencia de suero sanguíneo en donde la sobrevivencia de los nematodos paso de 75% a 55% en un lapso de tiempo de 24horas al final del ensayo (Figura 14). Estos datos indicaron que la concentración de glucosa en el medio de cultivo altera el efecto del suero sanguíneo en la virulencia de la bacteria. Los resultados mostraron que la disminución de la concentración de glucosa en el medio M9 claramente mejoro la virulencia de las cepas, en comparación con la virulencia de los ensayos de cultivos de M9 con 0.5% de glucosa (Figura12).



12.8 Efecto del sobrenadante una menor concentración de glucosa en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo

Nuevamente Se realizaron ensayos de virulencia utilizando los sobrenadantes de las cepas *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505 de cultivos en M9 suplementados con 0.2% de glucosa y crecidos en presencia o ausencia de suero sanguíneo. Los resultados obtenidos mostraron que los nematodos incubados en presencia de los sobrenadantes provenientes de los cultivos suplementados con suero sanguíneo fueron más virulentos que los sobrenadantes de cultivos sin suero (Figura 15). Además, los resultados mostraron que la disminución de la concentración de glucosa en el medio M9 claramente mejoro la virulencia de los sobrenadantes, en comparación con la virulencia de los sobrenadantes obtenidos de cultivos de M9 con 0.5% de glucosa (Figura 9, 13 y 15).

El crecimiento de las bacterias en medio M9 con 0.2% de glucosa aumento el efecto del suero sanguíneo sobre la virulencia de las cepas, el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 proveniente de cultivos crecidos con suero sanguíneo, disminuyendo la sobrevivencia de los nematodos hasta aproximadamente 55% en comparación de la virulencia de los sobrenadantes del cultivo sin suero que fue de aproximadamente 61% en un lapso de 24horas (Figura 15). Resultados similares se observaron en el sobrenadante de *P. aeruginosa* pUM505 provenientes de los cultivos crecidos con suero sanguíneo que generan una sobrevivencia de aproximadamente 25% en comparación con la virulencia de los nematodos con sobrenadantes del cultivo sin suero que fue de aproximadamente 43% en un lapso de 24 horas (Figura 15). Estos datos indican que la concentración de glucosa en general tiene un efecto en la virulencia de las bacterias.

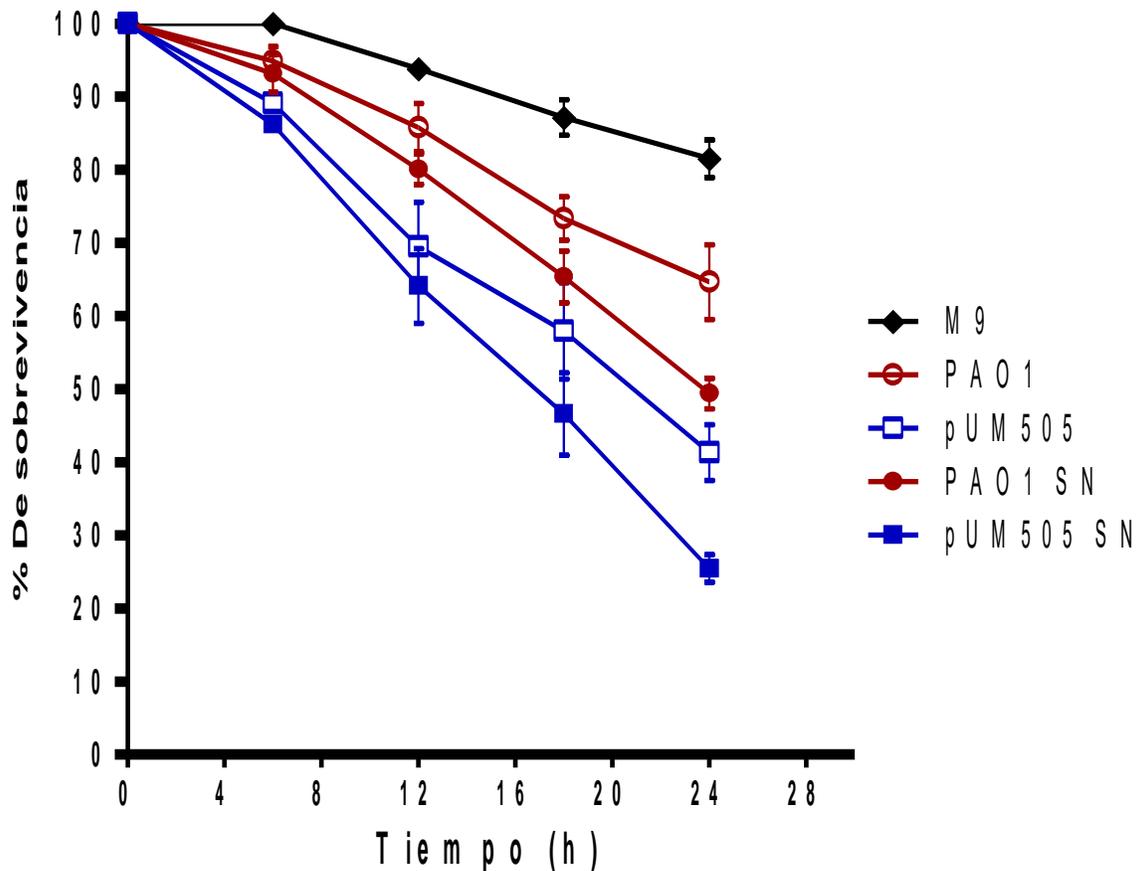


Figura 14. Efecto de la glucosa al 0.2% en la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa*. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con $1 \times 10^5 (\pm 1 \times 10^4)$ Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505, crecidas con anticipación en presencia y ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN) con una concentración de glucosa al 0.2%. los nematodos se incubaron a 19°C, para posteriormente determinar la cantidad de nematodos vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

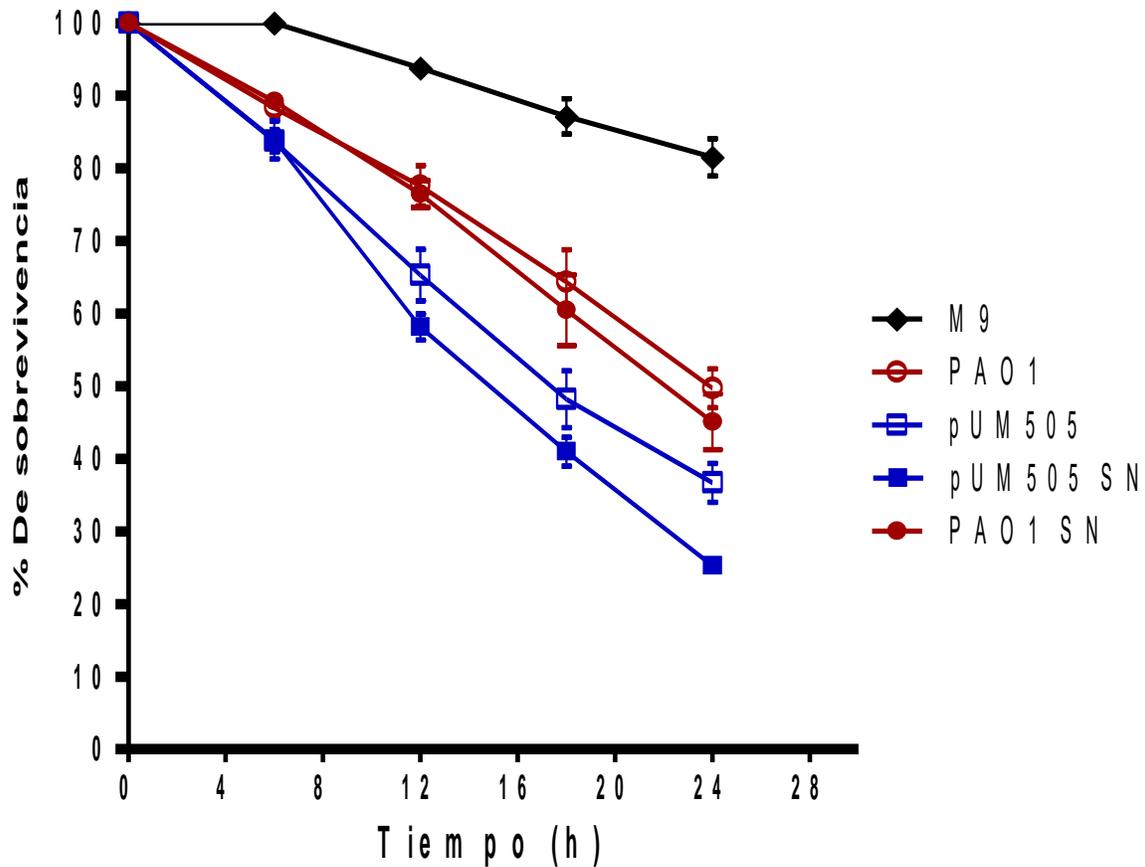


Figura 15. Efecto del sobrenadante de cultivos crecidos en M9 con glucosa al 0.2% en la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa*. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con sobrenadante proveniente de $1 \times 10^5 (\pm 1 \times 10^4)$ Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* pUM505, crecidas previamente en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN) en medio M9 suplementado con una concentración del 0.2%. Los nematodos se incubaron a 19°C, posteriormente se determinó la cantidad de nematodos vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.



12.9 Efecto de la concentración de glucosa en el medio de cultivo en la regulación de la virulencia generada por el suero nativo en los genes del plásmido pUM505

El medio de cultivo empleado para los ensayos de virulencia M9, que contiene 0.2% de glucosa. Se evaluó la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* pumAB, *P. aeruginosa* pumA y *P. aeruginosa* pumB, los cuales poseen a los genes *pumA* y *pumB*, respectivamente quienes codifican a proteínas del sistema toxina-antitoxina PumAB, previamente relacionado con la virulencia (Hernández-Ramírez y col., 2017).

Los resultados mostraron como se esperaba que la sobrevivencia de los nematodos disminuyó hasta aproximadamente el 19% en presencia de *P. aeruginosa* pumA (Figura 16). Sin embargo, los resultados mostraron que la adición de suero nativo al 5% en el medio M9 no modificó la virulencia de la bacteria (Figura 16). Contrario a lo observado para los nematodos incubados con las UFC de *P. aeruginosa* pumB o *P. aeruginosa* pumAB, donde el suero induce a un crecimiento de la virulencia (Figura 16).

12.10 Efecto del suero sanguíneo nativo al 5% en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 con la toxina PumA, la antitoxina PumB y la toxina-antitoxina PumAB

Se realizaron nuevamente ensayos de virulencia utilizando el sobrenadante de *P. aeruginosa* pumA, *P. aeruginosa* pumB y *P. aeruginosa* pumAB crecidos en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo. Los resultados mostraron una disminución en la sobrevivencia del nematodo *C. elegans* al ser incubados con el sobrenadante las cepas de *P. aeruginosa* pumAB y *P. aeruginosa* pumB de cultivos crecidos en presencia de suero sanguíneo nativo (figura 17). Estos datos confirman que el suero regula la virulencia de factores de virulencia como el sistema toxina-antitoxina PumAB que son codificados por el plásmido pUM505.

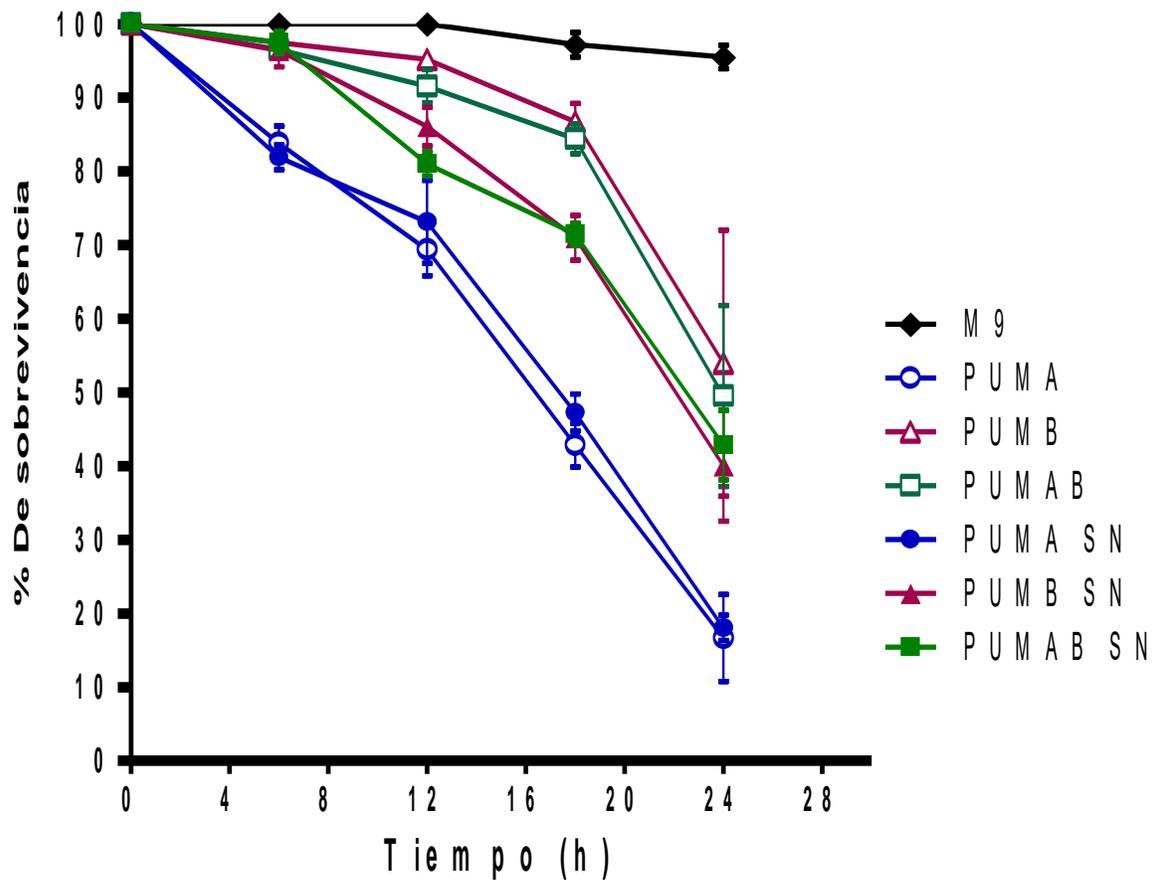


Figura 16. Efecto de la glucosa al 0.2% en la virulencia conferida por el sistema toxina-antitoxina PumAB del plásmido pUM505. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con 1×10^5 ($\pm 1 \times 10^4$) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas al 0.2% de glucosa en presencia y ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN). Los nematodos se incubaron a 19°C, para posteriormente determinar la cantidad de nematodos vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

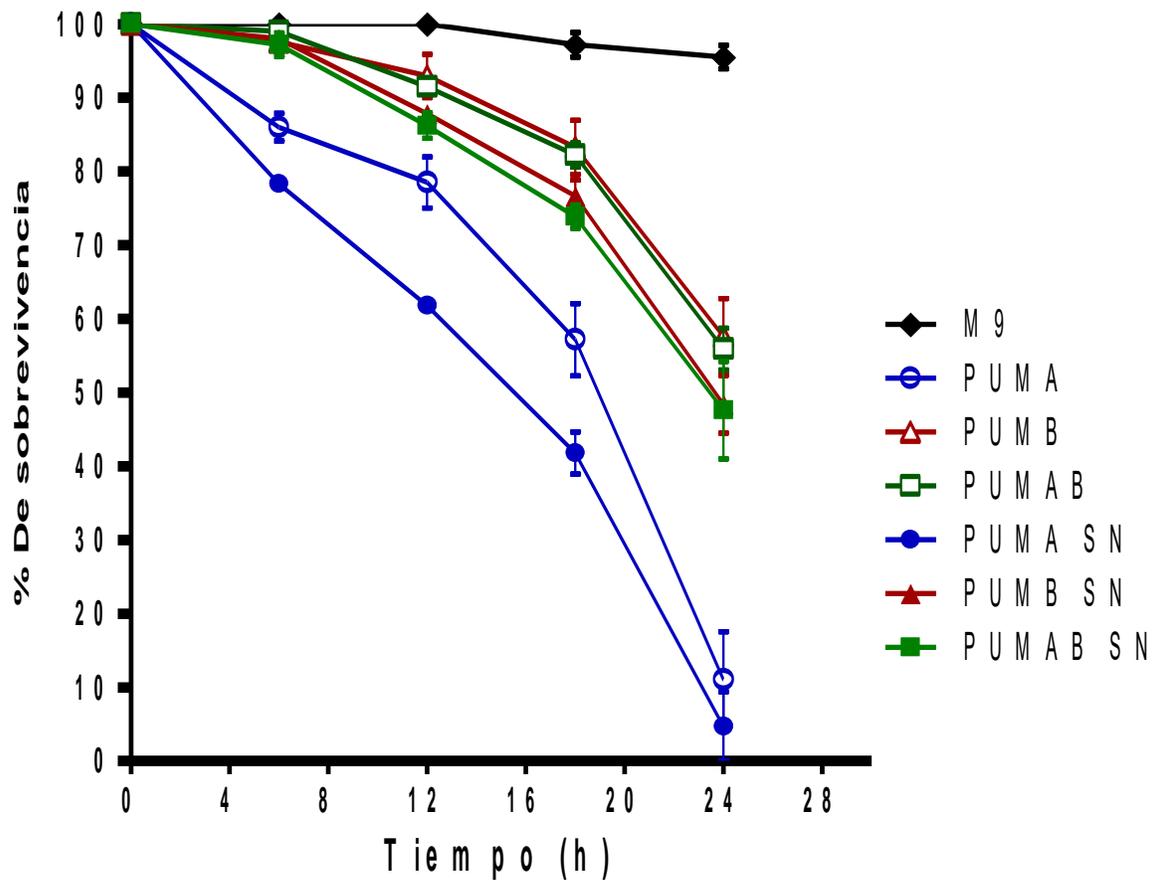


Figura 17. Efecto del sobrenadante de cultivos crecidos en M9 con glucosa al 0.2% en la virulencia conferida por el sistema toxina-antitoxina del plásmido pUM505. Grupos de 15-20 nematodos se incubaron con sobrenadante previamente de 1×10^5 ($\pm 1 \times 10^4$) Unidades Formadoras de Colonias de *P. aeruginosa* PAO1 transformadas con vectores que poseen el gen *pumA*, *pumB* o *pumAB*, crecidas al 0.2% de glucosa en presencia o ausencia de suero sanguíneo nativo al 5% (SN) para posteriormente centrifugarlas para obtener el sobrenadante. Los nematodos se incubaron a 19°C, posteriormente se determinó la cantidad de nematodos vivos cada 6 horas. Los datos muestran la media de duplicados de 2 ensayos independientes.

13. DISCUSIÓN

P. aeruginosa es considerada una de las principales bacterias que pueden causar infecciones, en esta agrupación se encuentran bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, especies de *Klebsiella*, enterococos, estreptococos y estafilococos coagulasa negativos. En países de altos ingresos este grupo de bacterias poseen un pronóstico de una tasa de mortalidad del 40%, que van de 113 a 204 por cada 100, 000 habitantes, aunado a que son uno de los principales responsables de las infecciones en las unidades de cuidados intensivos. *P. aeruginosa* es considerada una bacteria patógeno oportunista asociada a infecciones nosocomiales, con una tasa de mortalidad elevada. Esta bacteria posee la capacidad de sobrevivir en diferentes ambientes como plantas, animales y humanos. *P. aeruginosa* puede sobrevivir en el cuerpo humano gracias a diversos factores de virulencia y mecanismos que le permiten evadir la defensa del huésped, cruzando así las barreras epiteliales y endoteliales para llegar al torrente sanguíneo (Pont y col., 2020).

El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado, este plásmido confiere resistencia a cromato y mercurio. El plásmido pUM505 es un replicón circular con 123,322 pares de bases (pb) y contiene 138 regiones codificantes que posee dos islas genómicas las que contienen genes implicados en la resistencia a metales y en la virulencia, respectivamente (Ramírez Díaz y col., 2011; Rodríguez-Andrade y col., 2015).

Una de las islas genómicas del plásmido pUM505 se clasificó como una isla de patogenicidad (PAI) dado a que posee genes que codifican a proteínas que participan en la virulencia de la bacteria (Rodríguez-Andrade y col., 2015). La PAI de pUM505 contiene

los *orfs* 123 y 124 (renombrados como *pumA* y *pumB*) que codifican al sistema toxina-antitoxina PumAB. El *orf123* codifica a la toxina PumA y el *orf124* codifica a la antitoxina PumB. La proteína PumA aumenta la virulencia de la bacteria gracias a sus efectos tóxicos los cuales son regulados por la proteína PumB. La proteína PumA pertenece a la familia de toxinas RelE. La proteína PumB codifica una proteína de 96 aminoácidos, homologa a las antitoxinas tipo HTH de los sistemas toxina- antitoxina, PumB es un regulador de la transcripción de los *orfs* 123 y 124 (Hernández-Ramírez y col., 2023).

Cuando las bacterias se localizan en la sangre, estas se encuentran en presencia del sistema inmunitario del huésped. Se ha reportado que la infección sistémica por *P. aeruginosa* puede aumentar la transmisión de patógenos, sin embargo, los mecanismos que permiten que las bacterias persistan en la sangre no se conocen. Diversos estudios han evaluado la interacción de las bacterias y el sistema inmunitario del huésped, reportando que la exposición de los microorganismos a la sangre o el suero sanguíneo provoca cambios de la transcripcional de genes bacterianos que participan en la virulencia (Magaña, 2022). Un ejemplo es lo reportado en la bacteria *Bordetella bronchiseptica*, que al ser expuesta en sangre y suero se produjeron cambios transcripcionales sustanciales en la bacteria, aumentando sus genes asociados a virulencia, además de producir antígenos (Gestal y col., 2018). De igual manera el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en presencia de suero ocasiona el aumento de factores de virulencia como las hemolisinas, enterotoxinas, proteasas y factores de adquisición de hierro (Oogai, 2011). En el hongo *Mucor circinelloides* se ha reportado que la virulencia de las esporas aumenta al adicionar suero sanguíneo en el medio de cultivo YPG (Patiño-Medina y col., 2019). Mientras que en *P. aeruginosa* la adición de



suero al medio de cultivo condujo durante la fase temprana de crecimiento al aumentó en la expresión de diferentes genes como *pvdS*, *regA* y los genes de síntesis de pioverdina y redujo la expresión de los genes del QS, sin embargo, en la fase tardía el suero aumento la expresión de los genes de QS (Kruczek y col., 2014).

Por otro lado, ha sido ampliamente descrito que la glucosa es una fuente de energía, *P. aeruginosa* degrada a la glucosa mediante dos vías; una vía extracelular que lleva a cabo la oxidación de la glucosa a gluconato por la enzima glucosa deshidrogenasa, y la vía intracelular donde se lleva a cabo la oxidación de la glucosa por la ruta metabólica Entner-Doudoroff (Rojas y col., 2006). Sin embargo, la disminución de la concentración de glucosa en la bacteria genera un aumento en la virulencia (Rojas y col., 2006). En *L. donovani* la disminución en la cantidad de glucosa condujo a un aumento en la virulencia de la bacteria, sugiriendo que esto se debe a que, al disminuir la cantidad de glucosa, la bacteria entra en un estado de estrés oxidativo (Saini y col., 2016). De igual manera la falta de glucosa en el medio de crecimiento de *E. histolytica* genero el aumento de la virulencia de la bacteria, reafirmando la hipótesis de que la disminución de la glucosa en el medio de crecimiento aumenta la virulencia de las bacterias (Anaya, 2011).

El análisis de efecto del suero sanguíneo en la virulencia de *P. aeruginosa* que posee el plásmido pUM505, mostro que el suero sanguíneo nativo modifica de manera positiva la virulencia conferida por el plásmido, al incrementar la virulencia de la bacteria, sugiriendo que componentes del suero sanguíneo modulan los genes de virulencia del plásmido pUM505 (Magaña, 2022). El plásmido pUM505 es un plásmido conjugativo que fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* (Ramírez-Díaz y col., 2011). El plásmido pUM505 posee a *pumA* y *pumB* que codifican a un sistema Toxina Antitoxina (TA)



denominado PumAB (Ramírez-Díaz y col., 2011). La proteína PumA del sistema TA, codifica a una toxina tipo RelE, la cual mostró que cuando se expresa de manera individual en *E. coli* y *P. aeruginosa* es capaz de incrementar la virulencia de las bacterias (Hernández-Ramírez y col., 2018). La antitoxina PumB por su parte es capaz de neutralizar los efectos tóxicos generados por la toxina PumA, esto cuando el gen *pumB* es coexpresado con el gen *pumA*, indicando que el sistema PumAB desempeña un papel importante en la virulencia de las bacterias que los poseen (Hernández-Ramírez y col., 2018). El estudio de efecto del suero sanguíneo en la virulencia conferida por el sistema PumAB del plásmido pUM505 mostró que el crecimiento bacteriano en presencia de suero disminuye la virulencia conferida por la toxina PumA (cuando esta se expresa de manera individual), sin embargo, el suero aumento la virulencia de la bacteria cuando se expresó el gen *pumB* (que codifica a la antitoxina PumB) o los genes *pumA* y *pumB* de manera conjunta, permitiendo concluir que el suero sanguíneo modifica la virulencia conferida por genes presentes en el plásmido pUM505 (Magaña, 2022). Estos resultados fueron similares con respecto a los reportado por otros grupos de trabajo, los cuales reportaron que la presencia de suero aumentó la expresión de genes relacionados con la virulencia y la capacidad de daño de las bacterias (Kruczeky col., 2014).

Teniendo como antecedente que en *P. aeruginosa*, el suero regula positiva o negativamente la expresión de genes de virulencia codificados en el plásmido pUM505 en este trabajo se planteó determinar primero el efecto del suero sanguíneo en la virulencia de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, cepa que fue empleada como receptora del plásmido pUM505, y segundo, el efecto de cambios en la concentración de la glucosa en el medio de cultivo sobre la virulencia y el efecto del suero sanguíneo en las bacterias.

Este estudio mostró que el suero sanguíneo también modifica la virulencia codificada por genes presentes en el cromosoma de *P. aeruginosa* PAO1, ya que la presencia del suero en el medio de cultivo incremento ligeramente la virulencia de la bacteria. Sin embargo, el efecto fue menor con respecto al incremento en el nivel de virulencia generado por el suero en la cepa de *P. aeruginosa* pUM505, sugiriendo que un mayor número de genes codificados en el plásmido pUM505 son modulados por el suero o bien que el suero induce a un mayor cambio en la expresión de genes codificados en el plásmido pUM505, por lo que se requieren más estudios para evaluar estos planteamientos.

La disminución de glucosa en el medio de cultivo de la bacteria *P. aeruginosa* con el plásmido pUM505 mostró un aumento en la virulencia conferida por el plásmido. Estudios previos mostraron que la disminución de glucosa en los medios de crecimiento de las bacterias generó al aumento de la virulencia, sugiriendo que esto se debe a que al disminuir la falta de nutrientes la bacteria entra a un estado de estrés oxidativo y que el incremento en el estrés oxidativo genera el aumento de la virulencia (Saini y col., 2016). Esto sugiere que algo similar podría ocurrir en el caso de la virulencia conferida por los genes del plásmido pUM505, donde el estrés inducido por la disminución de glucosa modifique la virulencia, sin embargo, más estudios son necesarios para argumentar esta hipótesis.

Por otro lado, se determinó que tanto la adición de suero sanguíneo nativo y la disminución de glucosa tuvo como consecuencia el aumento de la virulencia de las cepas *P. aeruginosa* pumB y *P. aeruginosa* pumAB. La antitoxina PumB actúa como un regulador que inhibe la expresión del sistema PumAB aunado a que degrada al mensajero del gen *pumA* (que codifica a la proteína *pumA*), estos mecanismos tienen

como consecuencia que la antitoxina PumB actué neutralizando 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). Lo que sugiere que tanto el suero sanguíneo como la disminución de glucosa al medio de cultivo pueden regular negativamente la función de PumB, lo que impide que esta pueda actuar sobre la toxina PumA.

Este trabajo demostró que tanto el suero sanguíneo nativo como la concentración de glucosa en el medio de cultivo pueden modificar la virulencia de las bacterias que es codificada por genes del plásmido pUM505.

14. CONCLUSIÓN

El suero sanguíneo y los cambios en la concentración de glucosa del medio en presencia o ausencia de suero aumenta la virulencia conferida por el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*.



15. BIBLIOGRAFIA

1. Al-Wrafy F, Brzozowska E, Górska S, Gamian A, Al-Wrafy FA. (2016). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postep. Hig Med Dosw.* 70(70): 78-91.
2. Arora SK, Ritchings BW, Almira EC, Lory S, Ramphal R. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.* 66 (3): 1000-1007.
3. Ayala T, Hertz R, Siman R, Syan S, Fausto D, Guillén N. y Ankri, S. (2011). El hambre de glucosa aumenta la virulencia de *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiology.* 5(8): 6-12
4. Bennett P. (2007). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacology.* 153: S347-S357.
5. Breidenstein EBM, De la Fuente-Nuñez C, Hancock REW. (2011). *Pseudomonas aeruginosa*. all roads lead to resistance. *Trends Microbiol;* 19:419-426.
6. Bimboim HC. y Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
7. Buts L, Lah J, Dao-Thi M, Wyns L. y Loris, R. (2005). Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci* 30, 672–679.
8. Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemotherapy.* 53 (6): 2227-2238.
9. Carmona C. (2013). La sangre. Apuntes universidad de Murcia. <http://www.enfervescente.com/privado/wp-content/uploads/2013/02/Bloque-5.-La-sangre.pdf>



10. Cejudo AG, Tejada M, Camargo A, Higuera JJ, 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_RECMBINANTE.pdf
11. Cendra MDM, Christodoulides M, Hossain P. (2017). Signaling mediated by toll-like receptor 5 sensing of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin influences IL-1 β and IL-18 production by primary fibroblasts derived from the human cornea. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7: 130.
12. 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>
13. Chotirmall SH, Smith SG, Gunaratnam C, Cosgrove S, Dimitrov BD, O'Neill SJ, (2012). Effect of estrogen on *Pseudomonas mucoidy* and exacerbations in cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 366 (21): 1978-1986.
14. Datta AR, Kothary MH, (1993). Effects of glucose, Growth temperature and pH on listeriolysin o production in *Listeria monocytogenes*. *App Environ. Microbiol.* 59(10): 3495-3497
15. Diggle, S. P., Matthijs, S., Wright, V. J., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Lamont, I. L., Kong, X., Hider, R. C., Cornelis, P., Cámara, 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.



16. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. (2007). Epidemiología, patogenia y tratamiento de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. *Drogas*. 67(3): 351-368.
17. Elliott J, Simoska O, Karasik S, Shear JB, Stevenson KJ. (2017). Conjuntos de ultramicroelectrodos de carbono transparente para la detección electroquímica de una toxina de guerra bacteriana, la piocianina. *Anal. Química*. 89 (12): 6285-6289.
18. Faezi S, Bahramand AR, Mahdavi M, Siadat SD, Sardari S, Nikokar I. (2017). Preparation of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-flagellin immunoconjugate. *Biologicals*; 47: 11-17.
19. Fernández, A. (2013). Microbiología. *Biología*. 20(1).
[//efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://ies-fernando-de-mena.centros.castillalamancha.es/sites/ies-fernando-de-mena.centros.castillalamancha.es/files/descargas/Tema%2020.%20Microbiolog%C3%ADa.pdf](http://ies-fernando-de-mena.centros.castillalamancha.es/sites/ies-fernando-de-mena.centros.castillalamancha.es/files/descargas/Tema%2020.%20Microbiolog%C3%ADa.pdf)
20. Gellatly SL, Hancock RE. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: New Insights into Pathogenesis and Host Defenses. *Pathogens and Disease* 67(3): 159-173.
21. Gerdes K, Christensen S, y Lobner-Olesen A. (2005). Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nat Rev Microbiol* 3: 371-382.
22. González-Pedrajo B, Dreyfus G. (2003). Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. *Mensaje bioquímico* Vol. XXVII 45-63.
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>
23. Gotta R, Wiese A, Iwanicki A, Obuchowki M, (2022). Influence of glucose on swarming and quorum sensing of *Dickeya Solani*. *Plosone*



24. He J, Baldini R, Deziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati N, Lee D, Urbach J, Goodman H. y Rahme J. (2002). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carrier two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 2530-2535
25. 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.
26. 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>
27. Hernández-Ramírez KC, Chávez-Jacobo VM, Valle-Maldonado MI, Patiño-Medina JA, Díaz-Pérez SP, Jácome-Galarza IE, Ortiz-Alvarado R, Meza-Carmen V. y Ramírez-Díaz MI. (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/>
28. Hernández-Ramírez KC, Valerio-Arellano B, Valle-Maldonado MI, Ruíz-Herrera LF, Meza-Carmen V. y Ramírez-Díaz MI. (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/>
29. Ish-Horowics D, Burke JF. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989-2998.

30. Jurėnaitė M, Markuckas A, Suziedeliene E. (2013). Identification and characterization of type II Toxin-Antitoxin systems in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. 195 (14):3165- 3172.
31. Kasari V, Mets T, Kaldalu N. (2013). Transcriptional cross-activation between toxin-antitoxin systems of *Escherichia coli*. BMC. Microbiolgy. 13(45):113.
32. Khan SA. (1997). Rolling-circle replication of bacterial plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev 61: 442-455.
33. Killough M, Rocgers A, Ingram R. (2022). *Pseudomonas aeruginosa*: avances recientes en el desarrollo de vacunas. Vacunas contra enfermedades infecciosas. 10 (7), 1100; <https://doi.org/10.3390/vaccines10071100>
34. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. (2006). Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Médecine Mal. Infect. 36 (2): 78-91.
35. Kirisits MJ, Parsek MR. (2006). Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? Cell. Microbiol. 8 (12): 1841-1849.
36. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jorgensen A, Molin S and Tolker-Nielsen T. (2010). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. Molecular Microbiology 48. 1511-1524.
37. Klockgether J, Munder A, Neugebeuer J, davenport C, Stanke F, Larbig K, Heeb S, Schöck U, Pohl T, Wiehlmann L. y Tümmler B. (2010). Genome Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Laboratory Strains. ASM Journals. 192:4. <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JB.01515-09>
38. 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/>
39. Lambris JD, Ricklin D and Geisbrecht BV. (2008). Complement evasion by human pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:132-142.
40. Li LL, Malone JE, Iglewski BH. (2007). Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *J. Bacteriol.* 189:4367-4374.
41. Lioy VS, Rey O, Balsa D, Pellicer T, Alonso JC. (2002). Un módulo toxina-antitoxina como diana para el desarrollo de antimicrobianos. 2010; 63 :31–39.
42. Lobato D. (2015). Contribución de los sistemas toxina-antitoxina de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium en la adaptación a la vida intracelular. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Madrid. https://docs.google.com/viewerng/viewer?url=https://digital.csic.es/bitstream/10261/137216/1/Tesis_Damian_Lobato_2015.pdf
43. Magaña-Cornejo MD. (2022). Estudio del efecto del suero sanguíneo en la virulencia conferida por el plásmido pUM505. [tesis]. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
44. 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
45. Maseda, H., Sawada I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae T., y Nomura, N. (2004). Enhancement of the mexAB-OprM Efflux Pump Expression by a Quorum-Sensing Autoinducer and Its Cancellation by a Regulator, MexT, of the mexEF-oprN Efflux

- Pump Operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(4):1320–28.
46. May T, Hinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault J, Roychoudhury S, Zielinski N, Berry A. y Rothmel R. (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. A key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol.* 4: 191: 206.
47. Meckclanos JJ. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. bacterial.* 174:1-7.
48. Meylan E, Tschopp J and Karin M. (2006). Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 7098:39-44.
49. Migula W. (1895). Ueber ein neues System der Bakterien. *Arb. Bakteriolog. Inst. Technisch. Hochsch. Karlsruhe*; 1:235-238
50. Montalvo CE, Nájera FP, Hernández T. (2013). Tejido Sanguíneo y Hematopoyesis. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/Tejido-sanguineo.pdf>
51. Murray P, Rosenthal K. y Pfaller M. (2013). *Microbiología médica*. (1era ed). Barcelona: Elsevier. 109-113
52. Oogai Y, Matsuo M, Hashimoto M, Kato F, Sugai M. y Komatsuzawa H. (2011). Expression of virulence factors by *Staphylococcus aureus* grown in serum. *AEM.* 77(22), 8097–8105. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/AEM.05316-11>
53. Palleroni N. (1984). Genus I. *Pseudomonas*. Ed Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins. Baltimore, M.A. 141-199



54. Patiño-Medina A., Vargas-Tejeda D, Valle-Maldonado M, Alejandre-Castañeda V, Jácome-Galarza I, Villegas-Moreno J, Nuñez-Anita R, Ramírez-Díaz MI, Ortiz-Alvarado R. y Meza-Carmen V. (2019). Sporulation on blood serum increases the virulence of *Mucor circinelloides*. *Microbial Pathogenesis*. 137(19) 4-7 137(57).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401019307788>
55. Persat A, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S. (2015). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 112(24): 7563-8.
56. Pinto UM, Pappas KM. y Winans SC. (2012). The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nature Reviews*.10: 755–765.
57. Pérez M. y Mota M. (1999). Morfología y estructura bacteriana. 23-29
<https://hopelchen.tecnm.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r130906.PDF>
58. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. (2009) Evolución histórica y estado actual de la taxonomía del género *Pseudomonas*. *Gineta. Evol.* 9(6): 1132-47.
59. Pollack M. (2002). *Pseudomonas aeruginosa*. En: Mandell, Douglas, Bennet eds. *Enfermedades Infecciosas: Principios y Prácticas*. 5ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana SA 2802-2834.
60. 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>
61. Rada B. (2017). Neutrophil extracellular trap release driven by bacterial motility: Relevance to cystic fibrosis lung disease. *Commun. Integr. Biol.* 10(2).



62. Ramírez-Díaz MI, 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. 66(1), 7–18.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147619X11000217?via%3Dihub>
63. Reiriz J. (2015). Sistema inmune y la sangre. Universidad de Barcelona.
<https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/102/Sangre.pdf?1358605574>
64. 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.
65. Rojas O, Villafaña J, González O, Nungaray J. (2006). Análisis de rutas metabólicas en *Pseudomonas aeruginosa* para la producción de polihidroxicanoatos a partir de glucosa usando modos elementales. e-Gnosis. 4(12).
<https://www.redalyc.org/pdf/730/73000412.pdf>
66. Romero D. y Palacios R. (1997). Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. Annu. Rev. Genet. 31: 91-111.
67. Saini S, Kumar A, Singh R, Das S, Abhishek K, Kumar A, Verma S, Mandal A, Hasan A, Purkait B, Kumar A, Kumar K, Das P. (2016). La privación de glucosa inducida por la regulación al alza del fosfoenolpiruvato carboxicinasa modula la virulencia en *Leishmania donovani*. Molecular biol. 102(6): 1020-1042.
68. Sambrook J, Fritsch EF. y Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. (2° ed). Cold Spring Harbor.

69. Singleton P. (1999). *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*. (5° ed). Wiley.
70. Sorensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N. y Wuertz S. (2005). Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: a critical review. *Nature Rev.* 3: 700- 710.
71. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406:959-964.
72. Thomas MC. (2000). Paradigms of plasmid organization. *Molecular Microbiol.* 37(3): 485-491.
73. Tortora G. y Derrickson B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología*. (13° ed). Cd. México: Panamericana.
74. Van Melderen L, Saavedra De Bast M. (2009). Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities? *PLoS Genet.* 5, e1000437.
75. Waters, M. W. y Bassler, B. L. (2005). Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 21:319–46.
76. Weigel L, Clewell D, Gill S, Clark N, McDougal J, Flannagan S, Kolonay J, Shetty J, Killgore G. y Tenover F. (2003). Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 5650:1569-1571.
77. Woong Chung J, Zheng-Hao Piao, Suk Ran Yoon, Mi Sun Kim, Mira Jeong, Suk Hyung Lee. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* eliminates natural killer cells via phagocytosis-induced apoptosis. *PLoS Pathog.* 5(8):10-12.
78. Wu HJ, Wang AHJ and Jennings MP. (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol.* 12:93-101.

79. Yordanov D, Strateva T. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* - un fenómeno de resistencia bacteriana. J. Med. Microbiol. 58(9): 1133-48.
80. Yu XJ, McGourty K, Liu M, Unsworth KE and Holden DW. (2010). pH Sensing by Intracellular Salmonella Induces effector translocation. Science 5981:1040-1043.
81. Zhou Y, Call DR. y Broschat SL. (2012). Genetic relationship among 527 Gram negative bacterial plasmids. Plasmid. 68(2): 133-141.
82. Zipfel PF, Würzner R and Skerk C. Review. (2007). Complement evasion of pathogens: Common strategies are shared by diverse organisms. Mol. Immunol. 16 3850-3857.