



Universidad Michoacana de San
Nicolás de Hidalgo



Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Maestría en Biología Experimental

**“Estudio del papel de proteínas homologas a ChrA de
pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* en la virulencia”**

TESIS

Para obtener el título de:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta:

Q.F.B. Andrea Chávez Martínez

Asesora:

D.C. Martha Isela Ramírez Díaz

Morelia, Michoacán. Junio del 2026

Algunos piensan que tener un bebé puede llegar a frenar tus sueños y yo, en ella, solo veo mi mayor motivación para cumplirlos.

Con dedicatoria especial para mi hija, Rommina, esto y todo lo que hago es para ti, espero algún día te sientas orgullosa de lo que hemos logrado.

Agradecimientos

Este gran logro no es solo mío, porque nunca he estado sola, detrás de cada paso están todas las personas que me han acompañado, apoyado y creído en mí.

En primer lugar, agradezco a mi niña, el amor de mi vida, por siempre esperarme con una sonrisa y los brazos abiertos cuando llego a casa, por ser tan inteligente, valiente, amable, intrépida. Gracias por llegar a mi vida y ser el impulso que necesitaba para redirigirla. Te amo con cada fibra de mi ser.

Y porque nada de esto sería posible sin el apoyo de mis padres, Ana e Israel. Gracias por creer en mí, por estar en cada paso que doy y aunque no siempre es fácil entender mis decisiones e ideas, intentan respetarlas. Sobre todo a mi mamá por cuidar de mi hija cuando yo estoy trabajando y por quererla tanto.

A mi familia, mi abue, abuelito David, abuelita Elvira, tíodan, abuelito Roberto, tíos y primos Martínez. Gracias por creer en mí y siempre apoyarme, han sido gran parte del proceso. En particular a mi prima, comadre, mi compañera y mi persona, Paulina, gracias por tu apoyo incondicional y por siempre estar para nosotras, te amamos.

Quiero hacer una mención especial para mi abuelito David, que, aunque físicamente no puedes estar conmigo, sé que a donde vaya estarás ahí. Gracias por creer en mí y en lo que soy capaz más que nadie, por echarme porras todo el tiempo y por quererme tanto. Siempre me vas a hacer falta. Tu perico seguirá caminando con la fuerza que le enseñaste.

Mis amigos de la prepa, que han estado por más de 10 años conmigo y el lazo tan fuerte que hemos formado. Y mis amigos de la licenciatura que, aunque cada uno ha tomado su rumbo siempre los recuerdo con cariño.

Mis amigos de la maestría, Diana, Kassandra, Eli y Julian por su gran amistad. A Daniel por el apoyo en los momentos difíciles. A Joshua por todo lo aprendido, confiado y compartido. Agradezco especialmente a Angeles por su gran amistad y todo el apoyo que me ha brindado, gracias a la vida pudimos conectar y espero que nos permita muchas más anécdotas juntas, me siento enormemente afortunada de que una mujer como tú este en la vida de mi hija y la mía, te quiero mucho. Y gracias a Cristo Rey que me dio la oportunidad de conocer una amiga tan linda como Yami.

Mis niños de laboratorio Fer, Carlos, Omar, Arath y Abril que no solo fueron un gran equipo de trabajo, también se volvieron mis amigos.

Al D.C. Macario por su apoyo y ayuda en el laboratorio, incluso a la distancia. Al D.C. Marco por su colaboración en el procesamiento de muestras de RNA.

Gracias a mi asesora la D.C. Martha Isela Ramírez Díaz, por permitirme trabajar en su laboratorio, por resolver mis dudas, por su comprensión, por impulsarme a dar lo mejor de mí y por todo su conocimiento compartido, espero saberlo aprovechar. Su apoyo dejó una huella importante en mi formación.

A mis sinodales los D.C. Gustavo Santoyo, D.C. Adolfo López y al D.C. Ernesto Pineda, por ser un pilar importante en este proyecto. Particularmente, agradezco al D.C. Víctor Meza por el apoyo y motivación para realizar este trabajo, y por su ardua labor.

A CECIHTI por la beca otorgada para la realización de mi proyecto.

Por último, me agradezco a mí por todo el esfuerzo puesto, por no rendirme y continuar con mis sueños. NUNA DEJES DE CREER EN TI.

Índice

1	Resumen	1
2	Abstract	3
3	Introducción	5
3.1	Generalidades de las bacterias	5
3.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
3.2.1	Factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	7
3.2.2	Regulación de la virulencia en <i>P. aeruginosa</i>	9
3.2.3	Sistemas Las y Rhl del QS	10
3.3	Transferencia de material genético	10
3.3.1	Plásmidos	11
3.4	Sistemas de resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos	11
3.4.1	Membrana externa de <i>P. aeruginosa</i>	11
3.4.2	Porinas	12
3.4.3	Sistemas de expulsión	12
4	Antecedentes	14
4.1	Plásmido pUM505	14
4.2	Sistema de resistencia a cromato conferida por el plásmido pUM505	14
4.2.1	Generalidades y toxicidad del cromo	14
4.2.2	Transporte del cromo al interior celular	16
4.2.3	Determinantes de resistencia a cromato de pUM505	17
4.2.4	Resistencia a cromato conferida por la proteína ChrA del plásmido pUM505	18

4.3	Súperfamilia CHR de resistencia a cromato	20
4.3.1	Proteína ChrA2 de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	23
4.3.2	Proteínas Chr3N-C de <i>Bacillus subtilis</i> 168	23
4.4	Papel del plásmido pUM505 en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	26
4.4.1	Plásmido recombinante pH26 que confiere virulencia.....	26
4.4.2	Virulencia conferida por el operón de resistencia a cromato chr	29
5	Justificación	31
6	Hipótesis	32
7	Objetivos	32
7.1	Objetivo general	32
7.2	Objetivos específicos	32
8	Estrategia experimental.....	33
9	Materiales	34
9.1	Reactivos y medios de cultivo.....	34
9.2	Cepas.....	35
10	Métodos	36
10.1	Aislamiento del DNA plasmídico mediante lisis alcalina.....	36
10.2	Extracción de DNA por calor	37
10.3	PCR	37
10.4	Electroforesis en gel de agarosa	40
10.5	Transformación por el método de electroporación	40
10.6	Ensayos de resistencia a cromato.....	41
10.7	Ensayos de virulencia de la cepa y toxicidad de los sobrenadantes en el modelo del nemátodo <i>C. elegans</i>	41

10.8	Obtención del sobrenadante total.....	42
10.9	Cuantificación de producción de peróxido de hidrógeno.....	42
10.10	Determinación de la tasa de consumo de oxígeno.....	44
10.11	Análisis de RT-qPCR.....	44
10.12	Cuantificación de factores de virulencia.....	47
10.12.1	Cuantificación de la producción de pirocianina	47
10.12.2	Cuantificación de la producción de Biofilm	47
10.12.3	Cuantificación de producción de pioverdina.....	47
10.12.4	Cuantificación de proteasa	48
10.12.5	Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina.....	48
10.13	Cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante	49
10.13.1	Columna de punto de corte de 3 kDa	49
10.13.2	Columna de punto de corte 30 kDa.....	50
11	Resultados.....	51
11.1	Objetivo 1 y 2	51
11.1.1	Transferencia de los genes <i>chr</i> a cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	51
11.1.2	Susceptibilidad de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes de resistencia a cromato	51
11.1.3	Transferencia de los plásmidos con los genes <i>chr</i> a cepas de <i>E. coli</i> JM101	52
11.1.4	Susceptibilidad de las cepas de <i>E. coli</i> JM101 con los genes de resistencia a cromato.....	52
11.1.5	Ensayo de toxicidad en <i>C. elegans</i> de los sobrenadantes.....	52
11.1.6	Ensayos de determinación de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes	54

11.1.7	Efecto del sulfato (SO_4^-) en la resistencia a cromato de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr3NC</i> y <i>chrA2</i>	57
11.1.8	Ensayos de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes con disminución en la concentración de sulfato en el medio.....	65
11.1.9	Ensayos de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes con aumento en la concentración de sulfato en el medio.....	65
11.1.10	Ensayos de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes con aumento en la concentración de fosfato en el medio.....	66
	De igual manera, se observó un ligero aumento en la toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos crecidos con un incremento de fosfato en el medio cultivo (Fig. 21 C y D).	66
11.1.11	Ensayos de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 $\Delta\text{lasI/rhII}$ con los genes de resistencia a cromato.....	70
11.1.12	Participación del potencial de membrana en el mecanismo de virulencia y toxicidad de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr</i>	71
11.1.13	Efecto de la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las bacterias de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr</i>	74
11.1.14	Inducción por cromato del nivel de toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chr3NC</i> y <i>chrA2</i>	82
11.1.15	Cuantificación de la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) de las cepas con los genes de resistencia a cromato	82
11.1.16	Consumo de oxígeno de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chr</i> en presencia de diferentes tratamientos	85
11.1.17	Cuantificación de la expresión de los genes <i>chr3NC</i> y <i>chrA2</i>	85
11.2	Objetivo 3.....	88
11.2.1	Toxicidad del sobrenadante de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chr</i> tratados con proteasa y calor	88

11.2.2	Cuantificación de factores de virulencia producidos por <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chr</i>	93
11.2.3	Efecto de la concentración de la glucosa del medio en la virulencia conferida por los genes <i>chrA</i>	93
11.2.4	Efecto de la toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr</i> tratados con ditioneitol (DTT)	97
11.2.5	Cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante de la cepa de <i>P. aeruginosa</i> con el gen <i>chrA</i>	99
12	Discusión	103
13	Conclusión	114
14	Bibliografías.....	115

Índice de figuras

Figura 1. Mapa genético de plásmido pUM505.....	15
Figura 2. Arreglo genético del operón de resistencia a cromato, <i>chrBAC</i> , del plásmido pUM505.	19
Figura 3. Mecanismo de transporte, daño y de expulsión de cromato.	21
Figura 4. Resistencia a cromato de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con el gen <i>chrA</i>	22
Figura 5. Susceptibilidad a cromato de la cepa <i>E. coli</i> W3110 con el gen <i>chrA2</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.	24
Figura 6. Susceptibilidad a cromato de la cepa <i>E. coli</i> W3110 con los genes <i>chr3NC</i> ..	25
Figura 7. Virulencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> en hoja de lechuga.	27
Figura 8. Virulencia de las clonas con plásmidos recombinantes del plásmido pUM505 en modelo murino.	28
Figura 9. Virulencia conferida por los genes del operón <i>chr</i>	30
Figura 11. Susceptibilidad a cromato de las bacterias de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chr3NC</i> y <i>chrA2</i>	55
Figura 12. Susceptibilidad a cromato de la cepa de <i>E. coli</i> JM101 con los genes de resistencia a cromato.	56
Figura 13. Toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con el gen <i>chrA</i>	59
Figura 14. Virulencia conferida por las transformantes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes de resistencia a cromato.	60

Figura 15. Toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes de resistencia a cromato.	61
Figura 16. Virulencia conferida por las bacterias de <i>E. coli</i> JM101 con los genes de resistencia a cromato.	62
Figura 17. Toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las cepas de <i>E. coli</i> JM101 con los genes de resistencia a cromato.	63
Figura 18. Curvas de susceptibilidad a K ₂ CrO ₄ con modificaciones en la concentración de sulfato en medio M9.	64
Figura 19. Virulencia y toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr</i> en medio con una disminución de la concentración de sulfato.	67
Figura 20. Efecto del sulfato en la virulencia y toxicidad de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr</i>	68
Figura 21.	69
Figura 22. Resistencia a cromato de las cepas <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Δ <i>lasI/rhII</i> con los genes <i>chr</i>	72
Figura 23. Virulencia y toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 Δ <i>lasI/rhII</i> con los genes <i>chr</i>	73
Figura 24. Susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr</i> en presencia de KCN.	76
Figura 25. Efecto del cianuro de potasio en la virulencia y toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr</i>	77

Figura 26. Efecto de la concentración de KCN en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pUC_ <i>chrA</i>).	78
Figura 27. Efecto de la concentración de KCN en la toxicidad de los sobrenadantes de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chr</i>	79
Figura 28. Susceptibilidad a cromato de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chr</i> en presencia de NAC.....	80
Figura 29. Efecto de la NAC en la virulencia y toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> . Los cultivos se crecieron a 37°C con agitación constante durante 22 h en	81
Figura 30. Toxicidad de los sobrenadantes y de los cultivos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 crecidos en presencia de una concentración subinhibitoria de cromato.	83
Figura 31. Cuantificación del consumo de oxígeno de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chr3NC</i> y <i>chrA2</i>	86
Figura 32. Cuantificación de los niveles de transcrito de los genes <i>chr</i> en las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	87
Figura 33. Efecto del tratamiento con proteasa o calor en la toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chr</i>	90
Figura 34. Virulencia de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> previamente tratada con calor.....	91
Figura 35. Toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr</i> tratados a diferentes temperaturas.....	92
Figura 36. Cuantificación de factores de virulencia de <i>P. aeruginosa</i>	94

Figura 37. Cuantificación de los niveles de fosfatasa alcalina en las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con los genes <i>chr</i>	95
Figura 38. Toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 con incremento de glucosa en el medio.	96
Figura 39. Toxicidad de los sobrenadantes y el efecto del tratamiento con DTT de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> con los genes <i>chrA</i> , <i>chr3NC</i> y <i>chrA2</i>	98
Figura 40. Toxicidad con el sobrenadante fraccionado (punto corte 3 kDa).	101
Figura 41. Toxicidad de las fracciones de la cromatografía con punto de corte de 30 kDa del sobrenadante.....	102

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes <i>chr</i>	38
Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos usados.....	38
Tabla 3. Condiciones para la amplificación de los genes <i>chr</i>	39
Tabla 4. Tratamientos de los sobrenadantes.	43
Tabla 4. Sondas utilizadas para RT-qPCR	46
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizadas para RT-qPCR.....	46

1 Resumen

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa ubicua y patógeno oportunista que produce muchos factores de virulencia. El plásmido conjugativo pUM505 (123 kb), aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa*, confiere resistencia al ion cromato mediante el operón *chrBAC*, siendo la proteína ChrA la que confiere resistencia. Además, al ser transferida ChrA incrementa la virulencia de *P. aeruginosa*. La proteína ChrA pertenece a la superfamilia de proteínas CHR que se clasifica en proteínas pequeñas o SCHR (~200 aa) y grandes o LCHR (~400 aa). La proteína Chra del pUM505 forma parte de la familia LCHR y cual comparte homología con la proteína ChrA2 de *Burkholderia xenovorans* LB400 y el par de proteínas Chr3NC de *Bacillus subtilis* 168, que corresponde a la familia de proteínas LCHR y SCHR, respectivamente. El objetivo del presente trabajo fue determinar el papel de las proteínas ChrA2 y Chr3NC homologas en la virulencia de las bacterias. En este trabajo se determinó que la expresión heteróloga en *P. aeruginosa* de los genes *chrA2* y *chr3NC* incrementaron la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 y la toxicidad de los sobrenadantes del cultivo, sugiriendo la secreción de una molécula de virulencia. Además, la expresión de los genes *chr* aumentó tanto el consumo de oxígeno de las bacterias como la producción de peróxido de hidrógeno. Cambios en la concentración de sulfato o fosfato en el medio de cultivo modificaron la toxicidad de los sobrenadantes; mientras que el uso de concentraciones subinhibitorias de cianuro de potasio (que abate el potencial de membrana), así como de N-acetilcisteína (molécula que neutraliza las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)) disminuyeron la virulencia. Además, la adición de concentraciones subinhibitorias de cromato (inductor de estrés oxidativo) al medio de cultivo aumentó la toxicidad de los sobrenadantes y los

niveles de RNAm de los genes *chr*, sugiriendo que el cromato actúa como un inductor. Estos datos en conjunto sugieren la participación del potencial de membrana y de las ROS en la virulencia conferida por las proteínas Chr. Por otro lado, los sobrenadantes de los cultivos provenientes de las cepas que expresan los genes *chr* perdieron su toxicidad después de ser tratados por calor, con proteasas y ditioneitol (agente reductor de enlaces disulfuro (DTT), sugiriendo que la molécula responsable del incremento de la virulencia es de carácter proteico; mientras que los ensayos de fraccionamiento molecular de los sobrenadantes producidos por las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chr* mostraron que la molécula que aumenta la toxicidad tiene un peso molecular entre 3 y 30 kDa.

Este trabajo nos permite concluir que las proteínas ChrA participan en el aumento de virulencia en cepas de *P. aeruginosa* probablemente a través de la secreción de una proteína y del cambio en los niveles de estrés oxidativo.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, gen, resistencia a cromato, virulencia y toxicidad.

2 Abstract

Pseudomonas aeruginosa is an ubiquitous Gram-negative bacteria and an opportunist pathogen that produces many virulence factors. The conjugative plasmid pUM505 (123 kb), isolated from a clinical strain of *P. aeruginosa*, confers resistance to chromate ions through the *chrBAC* operon, with the ChrA protein being responsible for this resistance. In addition, the transfer of ChrA has been shown to increase the virulence of *P. aeruginosa*. ChrA belongs to the CHR protein superfamily, which is classified into small CHR proteins (SCHR; ~200 aa) and large CHR proteins (LCHR; ~400aa). The ChrA protein encoded by pUM505 belongs to the LCHR family and shares homology with the ChrA2 protein of *Burkholderia xenovorans* LB400 and the Chr3NC protein pair of *Bacillus subtilis* 168, which belong to the LCHR and SCHR families, respectively.

The objective of this study was to determinate the role of the homologous proteins ChrA2 and Chr3NC in bacterial virulence. Heterologous expression of the *chrA2* and *chrk3NC* in *P. aeruginosa* increased both the virulence of *P. aeruginosa* PAO1 and the toxicity of culture supernatants, suggesting the secretion of a virulence associated molecule. Furthermore, expression of the *chr* genes increased bacterial oxygen consumption as well as hydrogen peroxide production. Changes in sulfate or phosphate concentrations in the culture medium altered the toxicity of supernatants, whereas the use of subinhibitory concentration of potassium cyanide (which dissipates the membrane potential) and N-acetylcysteine (a molecule that neutralizes Reactive Oxygen Species, ROS) reduce virulence. In addition, the addition of subinhibitory concentrations of chromate (an inducer of oxidative stress) to the culture medium increased both the toxicity

of the supernatants and the mRNA levels of the *chr* genes, suggesting that chromate acts as an inducer.

Taken together, these findings suggest the involvement of membrane potential and ROS in the virulence conferred by Chr proteins. Moreover, culture supernatants from strains expressing the *chr* genes lost their toxicity after treatment with heat, proteases and dithiothreitol (DTT, a reducing agent that treatment that disrupts disulfide), indicating that the molecule responsible for the increased virulence is a protein in nature. Molecular fractionation assays of the supernatants produced by *P. aeruginosa* strains expressing the *chr* genes showed that the molecule responsible for the increased has a molecular weight between 3 and 30 kDa.

In conclusion, this work demonstrates that ChrA proteins contribute to increased virulence in *P. aeruginosa* strains, likely through the secretion of a protein factor and alterations in oxidative stress levels.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, gen, resistance chromate, virulence and toxicity.

3 Introducción

3.1 Generalidades de las bacterias

Las bacterias son un grupo de organismos microscópicos unicelulares, con un tamaño entre los 0.5 y 5 micrómetros (μm), que se reproducen por fisión binaria; además de que poseen diversas formas incluyendo, cocos, bacilos, filamentos, vibrios y espirilos (Fernández, 2013). Pertenecen al reino de los procariotas, ya que no poseen comportamientos intracelulares que estén delimitados por membranas (carecen de membrana nuclear) (Pírez y Mota, 1999; Cervantes, 2015).

La estructura de las células bacterianas, es relativamente sencilla, en comparación con las células de los organismos superiores, que poseen componentes internos especializados. Están formados por pared celular rígida y una membrana interna flexible y selectiva, ribosomas y además del material genético cromosómico pueden poseer plásmidos. Algunas estructuras celulares pueden estar presentes solos en algunas bacterias, como los flagelos, pilis, cápsula y los esporos (Pírez y Mota, 1999; Cervantes, 2015).

La tinción Gram, es una prueba de clasificación de bacterias que se basa en las variaciones de la estructura membranal. Las bacterias Gram-positivas poseen una pared celular que consta de una membrana plasmática y una capa gruesa de peptidoglicano, mientras que la pared celular de las Gram-negativas y está formada por una capa delgada de peptidoglicano y una membrana externa compuesta por lipopolisacáridos (Brooks y col., 2014).

3.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa, en forma de bastón con medidas entre los 0.5 y 1 µm de diámetro, y entre 1.5 y 5 µm de largo (Peix y col., 2009), en cultivo produce una coloración azul verdoso derivado de la síntesis de piocianina (May y col., 1991) y cuenta con un flagelo que le confiere movilidad y le permite responder a estímulos químicos, así como localizar substratos en condiciones bajas (Ruiz, 2007). Además, *P. aeruginosa* es anaerobia facultativa y posee un metabolismo versátil, tiene la capacidad de crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o la arginina como fuente para la aceptación de protones, puede colonizar el agua y el suelo, con requerimientos nutricionales mínimos y tolerando temperaturas entre los 20 y 43 ° C. Es un organismo no fermentador de lactosa, posee la capacidad de usar fuentes de carbono y nitrógeno tales como acetato y amoníaco (Paz y col., 2019).

Dentro del género *Pseudomonas* la especie *P. aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas en humanos más importante y una de las principales causas de infecciones nosocomiales. Aunque *P. aeruginosa* ha sido ampliamente estudiado como un agente causante de infecciones respiratorias también causa infecciones en corneas y piel, así como otras infecciones severas como la neumonía bacteriana o bacteremia, en pacientes con enfermedades crónicas como la hipertensión, diabetes, insuficiencia cardíaca y artritis, entre otras (Nicolau, 2010; Paz y col., 2019). Las enfermedades infecciosas causadas por *P. aeruginosa* se complican debido a la resistencia intrínseca de la bacteria a una gran variedad de antibióticos y a su capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia a través de la Transferencia Horizontal de Genes (THG), por

lo que esta bacteria se asocia a elevados índices de mortalidad, siendo un serio problema de salud pública (Oliver y Nicolau, 2010; Lujan, 2015).

P. aeruginosa contiene un genoma accesorio, que consiste en bacteriófagos, plásmidos e islas genómicas, que se encuentran en algunas cepas, pero no en otras y pueden contribuir a la heterogeneidad de la virulencia (Battle y col., 2008)

3.2.1 Factores de virulencia de *P. aeruginosa*

Los factores de virulencia son moléculas o estructuras que permiten a las bacterias invadir, colonizar y dañar a un huésped, y representan una estrategia de supervivencia para las bacterias patógenas (Jarama, 2022). *P. aeruginosa* posee múltiples factores de virulencia como lo son los pilis, proteasas, elastasas, toxinas, la biopelícula y la capsula que en conjunto confieren propiedades que le permiten a la bacteria ser patógena (Rahme y col., 2000; Paz y col., 2019).

Pilis: los pilis son estructuras proteicas filamentosas y de carácter polar, esenciales para el inicio de la infección, ya que participan en la motilidad y la adhesión de la bacteria a distintas superficies. El tipo IV de *P. aeruginosa*, además desempeña un papel importante en el desarrollo y la agregación de biopelículas y confiere resistencia a la fagocitosis (Van Schaik, 2005; Burros, 2012).

Proteasas: *P. aeruginosa* posee un amplio repertorio de enzimas proteolíticas que son de suma importancia para la invasión en infecciones crónicas. Dentro de esta gran variedad encontramos las elastasas LasA y LasB, las cuales son capaces de degradar la elastina del huésped (Strateva y Mitov, 2011); y la proteasa alcalina, que además de interferir con componentes del endotelio (Galdino, y col., 2017), degrada proteínas y

citocinas puede contribuir a la producción de otros factores de virulencia como la piocianina (Laarman y col., 2012; Liyama y col. 2017).

Toxinas: Las toxinas secretadas por esta bacteria pueden generar diferentes daños. ExoT es la exotoxina más prevalente en aislados clínicos y genera la producción de citocinas proinflamatorias (Wagener y col., 2020). La toxina ExoY provoca la desintegración de microtubulos de actina, necrosis celular y alteración en la integridad de la barrera endotelial de las células del huésped (Stevens y col., 2014; Wagener y col., 2020). La exotoxina A se une a la célula del huésped y una vez en el interior induce necrosis en el sitio de colonización (Michalska y Wolf, 2015).

Biopelícula: *P. aeruginosa* es conocida por su capacidad de formar capa de biopelícula que hace a la bacteria altamente resistente a antibióticos, desinfectantes y a las defensas del huésped (Lee, y col., 2017; Yan, y col., 2019). Además, esta resistencia dificulta la eliminación bacteriana y permite el establecimiento de infecciones crónicas que representan un importante problema médico (Lee, y col., 2017).

La biopelícula está compuesta en su mayor parte por exopolisacáridos: como el alginato, Psl y Pel, así como de ADN extracelular y proteínas extracelulares (Yan, y col., 2019). Cabe destacar que un estudio reciente demostró que existen varias vías de regulación para el desarrollo de biopelículas y que la expresión génica que regula la respuesta al estrés y la adaptación en ambientes con limitación de oxígeno y hierro es fundamental para dicho proceso (Yan, y col., 2019; Thöming, y col., 2020).

Capsula: *P. aeruginosa* posee una capsula compuesta por exopolisacáridos, que facilita la adhesión celular, la formación de biopelículas y permite la evasión de la fagocitosis (Singh y col., 2022).

Piocianina: es un metabolito secundario producido por estas bacterias, que además es el causante de la coloración azul verdosa característica de las colonias *P. aeruginosa* (Gellatly y Hancock, 2013). Se asocia con enfermedades severas y problemas en el funcionamiento pulmonar, ya que puede incrementar la cantidad de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) intracelular, promoviendo el aumento del estrés oxidativo y dañando el DNA, proteínas y conduciendo a la lisis celular (Hall y col., 2016).

Pioverdina: es el sideróforo principal producido por *P. aeruginosa*, es un compuesto orgánico de bajo peso molecular utilizado para la adquisición de hierro (Fe^{3+}), nutriente esencial para el crecimiento bacteriano y la virulencia (Cornelis y Dingemans, 2013; Dauner y Skerra, 2020).

3.2.2 Regulación de la virulencia en *P. aeruginosa*

La percepción de Quorum o *Quorum sensing* (QS) es un mecanismo de señalización microbiana química donde se induce la expresión de varios genes, lo que a su vez permite la comunicación entre células y la adaptación a los cambios ambientales, siendo capaz de regular la expresión de aproximadamente el 10% de los genes de *P. aeruginosa* (Lee y Zhang, 2015; Kariminik, y col., 2017; Paz, y col., 2019; Kuaile, y col., 2025). *P. aeruginosa* posee cuatro sistemas de QS: Las, Rhl, Pqs, y lqs, los cuales están interconectados de forma sinérgica. Estos sistemas secretan moléculas llamadas auto-inductores o acil-homoserina lactona (AHL) que se difunde mediante las membranas bacterianas (Paz y col., 2019; Qiaogiang, y col., 2022). El sistema Las se encuentra en

la cima de la cadena de señalización, el cual controla positivamente la expresión de algunos genes de virulencia, así como de los genes de los otros sistemas de QS (Lee y col., 2013). En conjunto los sistemas de QS controlan la expresión de genes que participan en la virulencia de *P. aeruginosa*, como la formación de biopelícula, elastasas, exotoxina A y producción de exopolisacáridos (Lee y col., 2013; Lee y Zhang, 2015; Kariminik y col., 2017).

3.2.3 Sistemas Las y Rhl del QS

Los sistemas Las y Rhl del QS representan los sistemas regulatorios de mayor dominancia. En el sistema Las, la proteína LasI participa en la síntesis del N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona ($C_{12}HSL$) (auto-inductor del sistema Las). Posteriormente LasI se une a LasR (activador transcripcional), y de esta forma regula la transcripción de genes de virulencia (Nadal, y col., 2012).

De forma similar, la proteína RhlI del sistema Rhl sintetiza el auto-inductor N-butanoil-L-homoserina lactona (C_4HSL), que forma un complejo con la proteína activadora RhlR, participando principalmente en la regulación de la producción de ramnolípidos, lectinas y biopelícula (Kariminik y col., 2017).

3.3 Transferencia de material genético

La Transferencia Horizontal de Genes (THG) es el mecanismo a través del cual las bacterias llevan a cabo la transferencia de material genético. La THG puede ser mediada por conjugación, transducción o transfección, modula la evolución en el mundo procariota y de algunos procariotas (Boto, 2010).

La THG se asocia con la adquisición de nuevos determinantes de virulencia, nuevas propiedades metabólicas, resistencia a metales pesados o a antibióticos, así como degradación de compuestos xenobióticos (Martínez, 2007; Hernández-Ramírez y col., 2018).

3.3.1 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de DNA circular extracromosomal, generalmente de tamaño pequeño que se encuentran diseminados en varias especies bacterianas. Los plásmidos pueden replicarse de manera independiente del DNA cromosómico debido a un sitio de replicación propio. A diferencia del DNA cromosomal, no son necesarios para la viabilidad celular, pero por lo general contiene genes que contribuyen a la supervivencia en condiciones extremas como lo son la resistencia a antibióticos, a metales o en la virulencia (Smalla y col., 2000; Helinski, 2022). Los plásmidos son considerados elementos genéticos móviles importantes para la adaptación bacteriana que contribuyen a la adquisición de nuevas capacidades adaptativas (Smalla y col., 2000).

3.4 Sistemas de resistencia a antibióticos y compuestos tóxicos

P. aeruginosa posee una resistencia intrínseca a antibióticos, dada por su baja permeabilidad de su membrana externa, a la presencia y expresión de bombas de expulsión, porinas y β -lactamasas (Gellatly y Hancock, 2013; Pang y col., 2019).

3.4.1 Membrana externa de *P. aeruginosa*

La membrana externa de *P. aeruginosa* está compuesta en su mayor parte por lipopolisacáridos y funciona como una barrera estructural selectiva que previene la entrada de antibióticos y compuestos tóxicos para la célula (Pang y col., 2019).

3.4.2 Porinas

P. aeruginosa posee porinas que son proteínas transmembranales que ubican en la membrana externa limitando la entrada de antibióticos o compuestos tóxicos a la célula. En *P. aeruginosa* han sido identificados 26 tipos de porinas, siendo OprF la de mayor abundancia (Pang y col., 2019; Langendonk y col, 2021).

La proteína OprF posee diversas funciones en la célula bacteriana, como permitir el paso de moléculas pequeñas y iones (Chevalier y col., 2017), proporciona estabilidad estructural a la célula. Además, facilita la adhesión y formación de la biopelícula, participa en la interacción patógeno-huésped (Cassin y Shan, 2019).

Algunas otras porinas participan en el aumento de resistencia a antibióticos, como OprD y OprH, participando en la absorción de carbapenémicos y modificando la afinidad de las poliximinas por la membrana externa por la reducción de concentración de Mg^{2+} (Langendonk y col. 2021)

3.4.3 Sistemas de expulsión

Los sistemas de expulsión en bacterias son sistemas de proteínas de membrana que llevan a cabo la expulsión de moléculas evitando la concentración de los compuestos tóxicos en medio citoplasmático celular (Cervantes, 2017).

En *P. aeruginosa*, se han descrito diversos sistemas de expulsión como el sistema MexAB-OPrM que participa en la resistencia a antibióticos como quinolonas (Piddock, 2006). El sistema MexA-OPrM, además, contribuye en la resistencia a compuestos tóxicos como bromuro de etidio, un compuesto aromático fluorescente que se intercala

en la estructura del ADN impidiendo la replicación generando mutaciones o muerte (Xu y col., 2003).

4 Antecedentes

4.1 Plásmido pUM505

El plásmido pUM505 (Fig. 1) fue identificado como un plásmido conjugativo en una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado en Morelia, Michoacán, el cual confiere resistencia a cromo y mercurio. El plásmido pUM505 es un replicón circular de 123, 322 pares de bases (bp), que codifica a 138 marcos de lectura abierto (*orf*) (Ramírez-Díaz y col., 2011).

El plásmido pUM505 contiene dos islas genómicas, la primera, de un tamaño aproximadamente de 67 kilo bases (kb) contiene genes involucrados en la virulencia, la replicación, mantenimiento y partición del plásmido, y la transferencia conjugativa. La segunda isla de 31 kb contiene genes involucrados en resistencia a metales pesados y la movilidad de genes (Ramírez y col., 2011).

4.2 Sistema de resistencia a cromato conferida por el plásmido pUM505

4.2.1 Generalidades y toxicidad del cromo

El cromo (Cr) se encuentra en la tabla periódica en el grupo de los metales de transición y posee el número atómico 24. Es un metal de color blanco plateado, brillante y resistente, que no se corroe fácilmente. El Cr se presenta en varios estados de oxidación, Cr (II), Cr (III) y Cr (VI) (Superintendencia de Riesgos del Trabajo, 2019).

En la naturaleza el estado de oxidación del cromo es el Cr (III) y el cromo Cr (VI), siendo este último el segundo más estable y el más peligroso desde el punto de vista toxicológico (Pavesi y col., 2020). Independientemente de la forma en la que el Cr se absorba, los compuestos del Cr pueden sufrir una alteración de su estado de oxidación

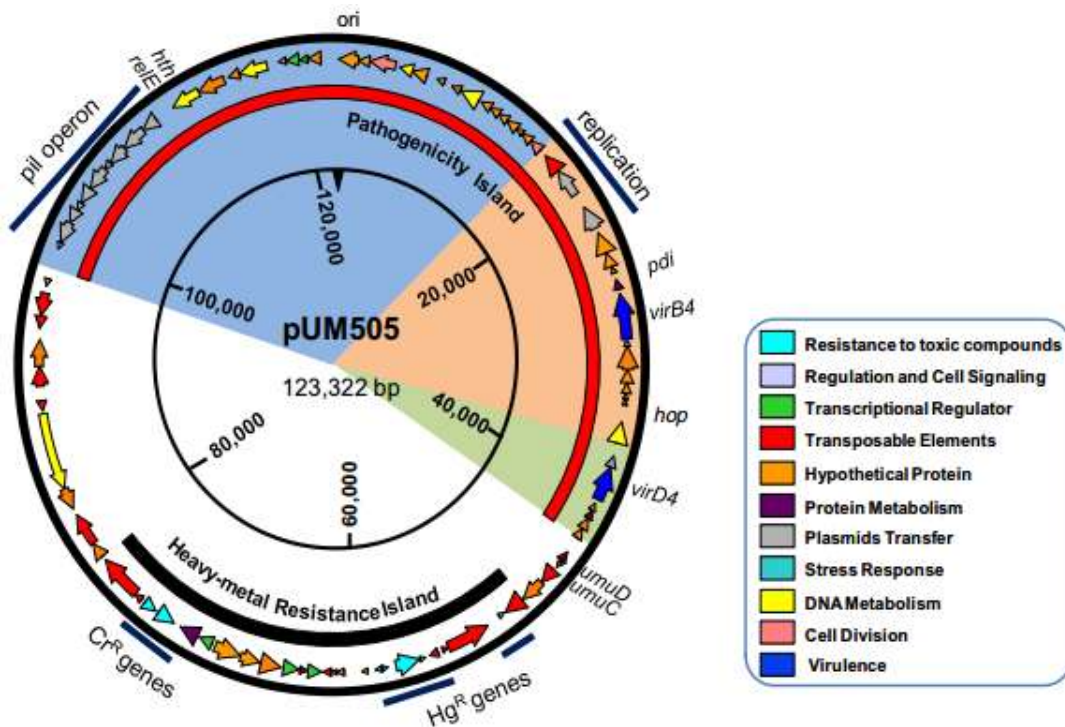


Figura 1. Mapa genético de plásmido pUM505. Con flecha o punta de flecha se muestran las regiones codificantes y la dirección de la transcripción. En el recuadro con colores se indica la función a los genes. Con bloques de colores se señalan los islotes del plásmido pUM505, corresponde a regiones del plásmido que muestran similitud en secuencia con otros genomas bacterianos. Las islas genómicas de patogenicidad (PAI) y de resistencia a metales pesados se muestran con las en barras roja y negra respectivamente. También se señalan con barras azules los genes involucrados en la transferencia conjugativa (operón pil), los genes de resistencia a metales (Cr^R y Hg^R). (Tomado de Ramírez y col., 2011).

y coordinación con moléculas biológicas. El Cr (VI), está relacionado con una serie de patologías, mientras que el Cr (III) ha sido considerado un micronutriente esencial que juega un papel de relevancia en el metabolismo de la glucosa (Álvarez y col., 2021; Mezencev y Gibbons, 2023).

Aunque el Cr (III) puede reaccionar con biomoléculas como el ADN, su baja capacidad para atravesar las membranas celulares debido a su insolubilidad, se ha relacionado con su baja actividad biológica y toxicológica, en comparación con el Cr (VI) (Pavesi y col., 2020; Mezencev y Gibbons, 2023).

El Cr (VI), además de ser hidrosoluble, posee una estructura tetraédrica y con frecuencia se encuentra unido al oxígeno, siendo así un fuerte agente oxidante. Los iones de relevancia del Cr (VI) son el cromato (CrO_4^{2-}) y el dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), el cromo hexavalente (CrO_4^-) es altamente nocivo para las células (Mertz, 1969).

4.2.2 Transporte del cromo al interior celular

El cromato ingresa a las células a través de la sulfato permeasa un transportador de membrana que introduce el sulfato (SO_4^-), un ion esencial para la célula. Debido a la similitud de estructura química tetraédrica y a la longitud de los enlaces en ambos oxianiones, la sulfato permeasa puede introducir el cromato siendo este ion un inhibidor competitivo del transporte de sulfato en bacterias (Fig. 3 A) (Ramírez-Díaz y col., 2008).

Una vez que ingresa a la célula, el Cr (VI) es reducido de forma rápida a Cr (III) por mecanismos inespecíficos (Fig. 3 B). El Cr (III) puede generar diversos efectos como daño a DNA o proteínas mediante la formación de aductos Cr-ADN (Fig. 3 C) (Cervantes y col., 2017).

En el proceso de reducción del Cr (VI) a Cr (III), se genera un aumento en la producción de Especies Reactivas de Oxígeno, o por sus siglas en inglés ROS, las cuales conducen a un aumento en el estrés oxidativo y desencadena en daño a proteínas, lípidos, DNA y RNA, afectando su estructura y correcto funcionamiento. Sin embargo, las ROS pueden neutralizarse por diferentes moléculas como la N-acetilcisteína o por la acción de enzimas como las superóxido dismutasas (SOD) y la glutatión peroxidasa (Fig. 3 D) (Shi y Dalas, 1990; Kadiiska y col., 1994; Cervantes y col., 2007). Al ingresar puede ejercer su efecto tóxico (Pardee y col., 1966; Katz y col., 1993; Cervantes y col., 2007).

4.2.3 Determinantes de resistencia a cromato de pUM505

El primer sistema bacteriano de resistencia a cromato descrito fue el codificado por el gen *chrA* (*orf* 90) en el plásmido pUM505 (Cervantes-Vega y col., 1986; Cervantes y Ohtake, 1988). El plásmido pUM505 codifica a la proteína de membrana ChrA, una proteína de 416 aminoácidos (aa), la cual es responsable de la resistencia a cromato (Cervantes y col., 1990), la proteína ChrA codificada en el plásmido pUM505 ha sido ampliamente estudiada por conferir resistencia a cromato mediante la expulsión de la molécula (Fig. 3 E) (Cervantes y col., 1990). La expresión de la proteína ChrA en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, incrementó la resistencia de la bacteria a cromato (Fig. 4), al funcionar como una bomba quimiosmótica que expulsa el ion cromato desde el interior celular hacia el periplasma (Cervantes y col., 1990; Álvarez y col., 1999).

La expulsión de las moléculas de cromato por la proteína ChrA es un sistema de transporte activo que requiere del potencial de membrana (Fig. 3 F) (Álvarez y col., 1999).

El gen *chrA* del plásmido pUM505 forma parte del operón *chr* conformado por los genes: *chrA*, *chrC* y *chrB*, (correspondiente a los *orfs* 90, 91 y 92 respectivamente) (Fig.

2). El operón *chr* se encuentra flanqueado por genes que codifican para una transposasa/integrasa tipo TnpA (*orf* 94) y una resolvasa/integrasa tipo TnpR (*orf* 93), sugiriendo que estos genes *chr* fueron adquiridos por transferencia genética. El gen *chrB* codifica para una proteína de 315 aa y juega un rol regulatorio en la expresión de la proteína ChrA. El gen *chrC* codifica para una proteína de 86 aa, que muestra similitud con el dominio amino terminal de la superóxido dismutasa de 199 aa codificada por el plásmido pMOL28 de *Cupriavidus metallidurans* CH34 y al transposón TnOChr de *Ochrobactrum tritici*, sugiriendo que la proteína ChrC del plásmido pUM505 está trunca, siendo probablemente una proteína no funcional (Ramírez-Díaz y col., 2011).

4.2.4 Resistencia a cromato conferida por la proteína ChrA del plásmido pUM505

Algunas bacterias poseen plásmidos con la capacidad de codificar para proteínas transportadoras de membrana, mediando la expulsión de cromato antes de la generación de daño. La proteína ChrA codificada en el plásmido pUM505 ha sido ampliamente estudiada por conferir resistencia a cromato mediante la expulsión de la molécula (Fig. 3 E) (Cervantes y col., 1990). La transferencia de la proteína ChrA a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, una cepa estándar de laboratorio, incrementa la resistencia a cromato (Fig. 4).

La proteína ChrA funciona como una bomba quimiosmótica que expulsa el ion cromato desde el interior celular hacia el periplasma y confiere un mecanismo de resistencia a Cr (VI) (Cervantes y col. 1990; Álvarez y col., 1999).

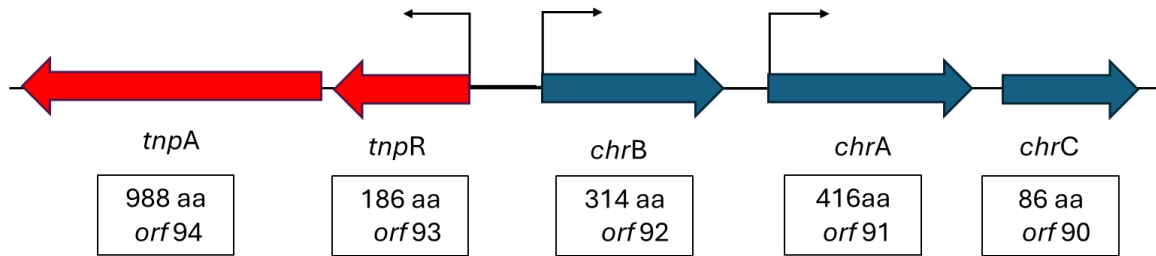


Figura 2. Arreglo genético del operón de resistencia a cromato, *chrBAC*, del plásmido pUM505. Las flechas azules representan los *orf*'s 92, 91 y 90, que codifican para las proteínas ChrB, ChrA y ChrC, respectivamente. Las flechas rojas muestran a los genes que codifican a la resolvasa/integrasa y a la transposasa integrasa, respectivamente. El sentido de las flechas indica el sentido de la transcripción (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).

La expulsión de las moléculas de cromato por la proteína ChrA es un sistema de transporte activo que requiere del potencial de membrana (Fig. 3 F) (Álvarez, A. y col., 1999).

4.3 Súperfamilia CHR de resistencia a cromato

La proteína de resistencia a cromato de pUM505, ChrA, pertenece a la superfamilia de resistencia a cromato denominada superfamilia CHR la cual, está conformada por un aproximado de 130 proteínas, de las cuales 128 son pertenecientes a bacterias, 1 a arqueas y 6 a hongos. La distribución de proteínas homólogas a ChrA en los tres dominios de la vida se sugiere un origen antiguo e importante para esta familia. Las proteínas CHR se clasifican en dos familias, con base al tamaño de las diferentes proteínas identificadas en la superfamilia CHR: proteínas monodominio denominadas SCHR las cuales presentan un tamaño de 123-234 aa y proteínas bidominio LCHR o CHR de cadena larga con una longitud de 345-494 aa. Las proteínas de la superfamilia CHR se clasificaron en diez subfamilias con base a su filogenia; las proteínas SCHR fueron agrupadas en tres subfamilias SCHR1 a SCHR3, mientras que las proteínas LCHR se agruparon en 6 subfamilias LCHR1 a LCHR6 (Díaz-Pérez y col., 2007).

El análisis de la secuencia de las proteínas de la superfamilia CHR sugirió que las proteínas LCHR o bidominio, podrían haber surgido de la fusión de dos genes SCHR en un evento evolutivo antiguo, aunque también podrían haber ocurrido eventos secundarios de fusión y fisión. La distribución de las proteínas LCHR y SCHR y sus diferencias genómicas, indican que las proteínas CHR comprenden al menos dos grupos parálogos dentro de esta superfamilia (Díaz-Pérez y col., 2007).

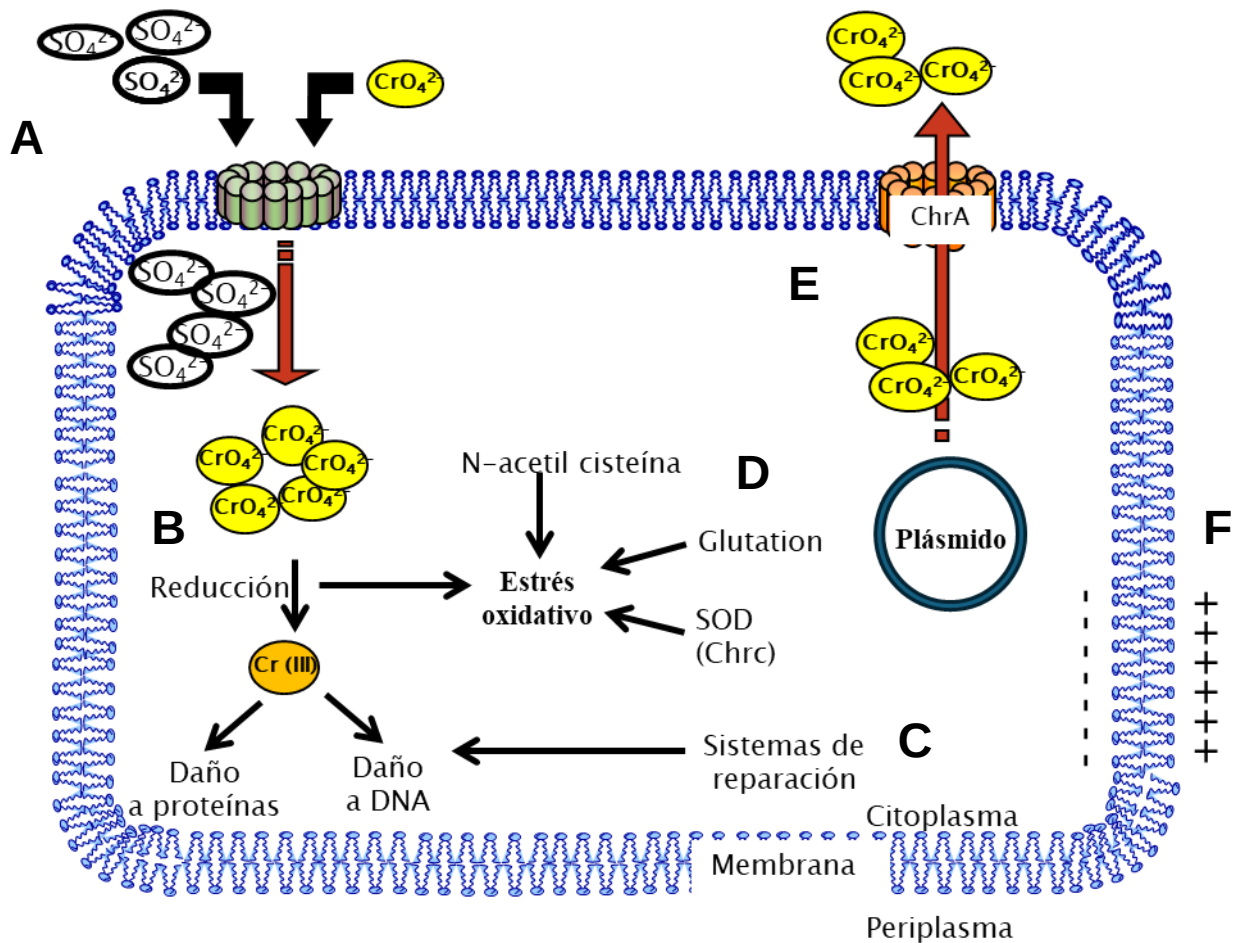


Figura 3. Mecanismo de transporte, daño y de expulsión de cromato. **A.** Ingreso del Cr (VI) en forma de CrO_4^{2-} a través de la sulfato permeasa de membrana. **B.** Reducción intracelular entre del Cr (VI) a Cr (III), que ocasiona la generación de estrés oxidativo y daño a moléculas orgánicas. **C.** Los sistemas de reparación de la célula neutralizan el daño generado por el Cr (III). **D.** Mecanismos celulares de neutralización de las ROS. **E.** Bomba de expulsión ChrA codificada por pUM505. **F.** Potencial de membrana requerido por las proteínas ChrA para la expulsión de CrO_4^{2-} . (Modificado de Álvarez y col., 1999; Ramírez y col., 2008).

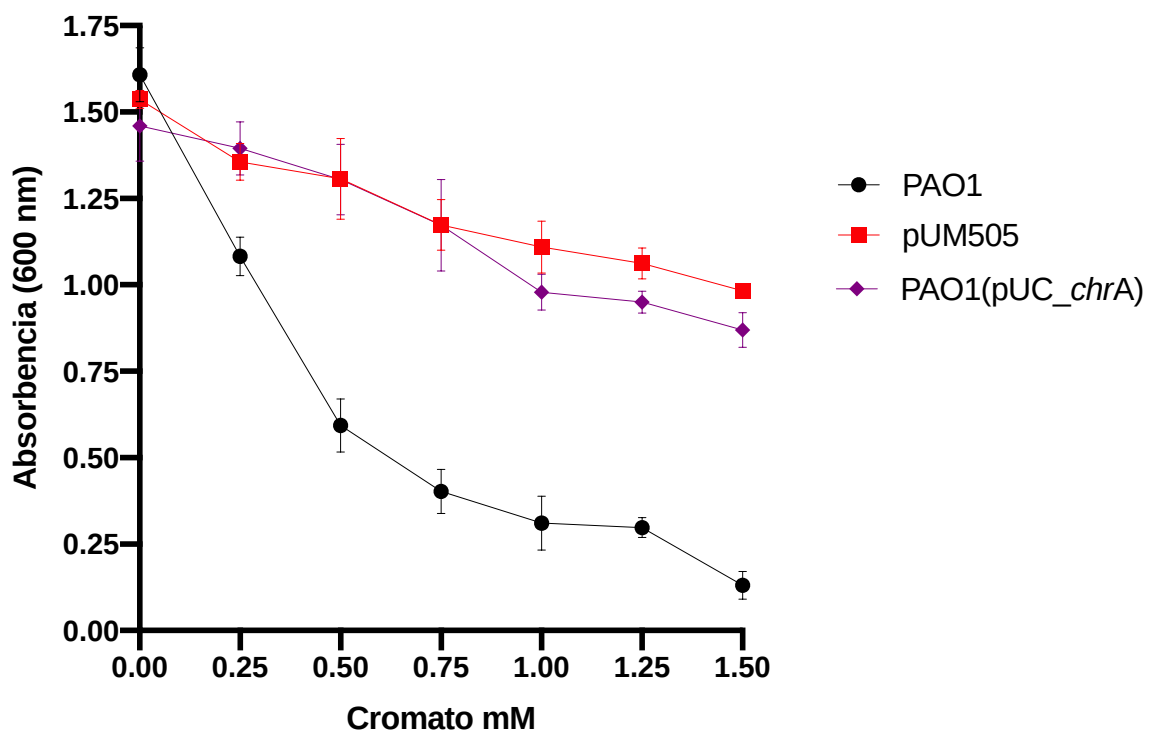


Figura 4. Resistencia a cromato de las cepas de *P. aeruginosa* con el gen *chrA*. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo durante 18 h a 37 °C con agitación constante, a concentraciones crecientes de K_2CrO_4 . Se midió la absorbencia a D.O. 590nm. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes N=3 (por duplicado), las barras corresponden a la desviación estándar (Tomado de Valerio-Arellano, datos sin publicar).

4.3.1 Proteína ChrA2 de *Burkholderia xenovorans* LB400

La cepa *B. xenovorans* LB400, ha sido ampliamente estudiada debido a la degradación de compuestos clorados, además de que fue aislada de suelos contaminados con bifenilos policlorados. El genoma de *B. xenovorans* posee 6 homólogos del gen *chrA* del plásmido pUM505 provenientes de sus 3 replicones (2 cromosomas y 1 megaplásmido) (Díaz-Pérez y col., 2007). Se determinó que cada uno de los homólogos *chr* de esta cepa confieren resistencia al cromato, aunque en diferentes condiciones y con diferente nivel (Díaz-Pérez y col., 2007). La proteína ChrA2 codificada por el gen *chrA2* del megaplásmido fue la proteína ChrA que confirió mayor nivel de resistencia. La proteína ChrA2 de *B. xenovorans* LB400 pertenece a la familia LCHR, los ensayos de susceptibilidad a cromato mostraron que la cepa con el gen interrumpido mostró un fenotipo sensible, y cuando el gen *chrA2* fue transferido a la cepa mutante la resistencia a cromato se restauró (Fig. 5). Este resultado indica que la proteína ChrA2 es la principal responsable de la resistencia a cromato en esta cepa (Reyes-Gallegos y col., 2016).

4.3.2 Proteínas Chr3N-C de *Bacillus subtilis* 168

La cepa de *B. subtilis* 168 posee en su genoma un par de genes con homología al gen *chrA* del plásmido pUM505 a los cuales se les nombró *chr3N* y *chr3C*, estos genes forman el operón *chr3NC*. Los genes *chr3N* y *chr3C* de *B. subtilis* codifican a las proteínas Chr3N de 197 aa y Chr3C de 178 aa respectivamente, las cuales fueron expresadas en la cepa *E. coli* W310, en donde confirieron resistencia a cromato de manera conjunta (Fig. 6), mientras que la transferencia individual de cada gen no confirió

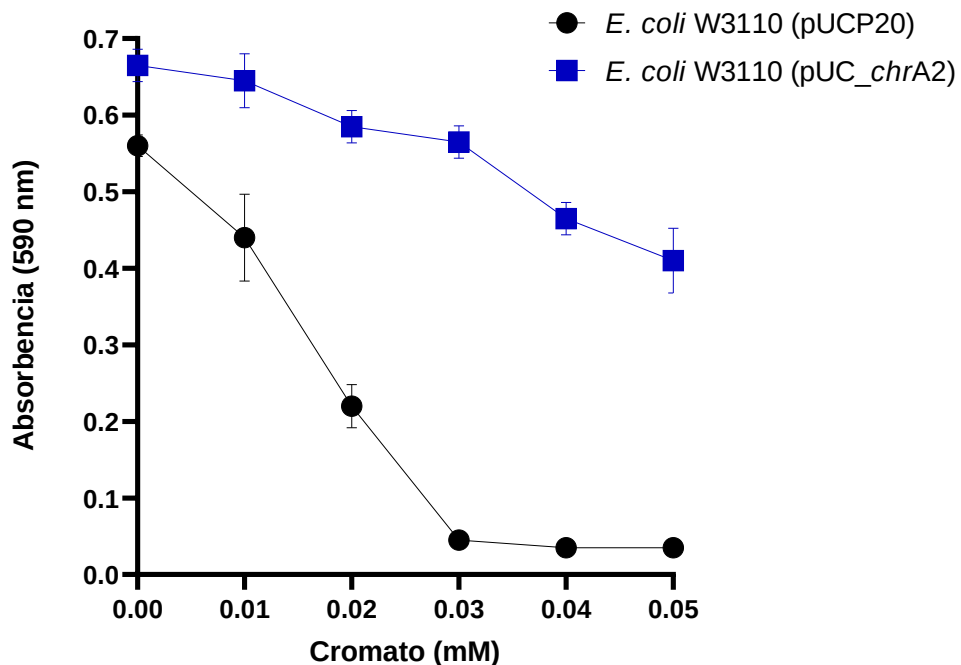


Figura 5. Susceptibilidad a cromato de la cepa *E. coli* W3110 con el gen *chrA2* de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos bacterianos se crecieron en medio M9 durante 20 h a 37 °C con agitación constante suplementados con diferentes concentraciones de K_2CrO_4 . El crecimiento se determinó midiendo la absorbencia a D.O. 590nm. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes N=2 (por duplicado), las barras corresponden a la desviación estándar (Modificado de León-Márquez, 2009).

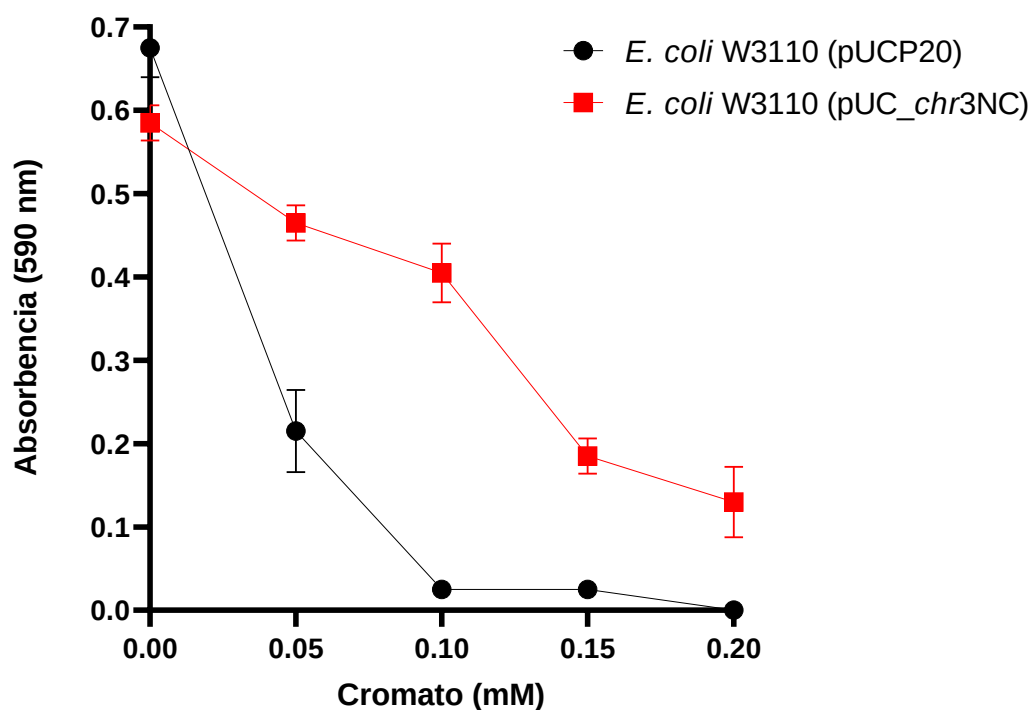


Figura 6. Susceptibilidad a cromato de la cepa *E. coli* W3110 con los genes *chr3NC*.

Los cultivos bacterianos fueron crecidos en medio M9 durante 22 h crecidas a 37 °C con agitación constante, a diferentes concentraciones de K_2CrO_4 . Se midió la absorbencia a D.O. 590nm. Se muestra el promedio de dos experimentos independientes N=2 (por duplicado), las barras corresponden a la desviación estándar (Modificado de Díaz-Magaña y col., 2009).

resistencia al ion, sugiriendo que los genes *chr3N* y *chr3C* son genes que codifican a un sistema de resistencia a cromato de tipo CHR (Díaz-Magaña y col., 2009).

4.4 Papel del plásmido pUM505 en la virulencia de *P. aeruginosa*

En el 2016 Rodríguez-Andrade y col., investigaron la participación del plásmido pUM505 en la virulencia de la cepa estándar *P. aeruginosa* PAO1 mediante ensayos de virulencia en hoja de lechuga (Fig. 7 A). La transferencia del plásmido pUM505 incrementó la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 a diferencia de la cepa PAO1 sin el plásmido (Fig. 7 B). Estos datos confirmaron que el plásmido pUM505 contiene genes funcionales que aumentan la virulencia de *P. aeruginosa* (Rodríguez-Andrade y col., 2016).

4.4.1 Plásmido recombinante pH26 que confiere virulencia

En 2016 Rodríguez-Andrade y col., realizaron la construcción de una biblioteca de 103 clonas con plásmidos recombinantes, obtenidos a partir de la clonación de fragmentos de DNA del plásmido pUM505. Las clonas fueron evaluadas en su capacidad de incrementar la virulencia de *E. coli* JM101 y *P. aeruginosa* PAO1 en modelos de hoja de lechuga, *mus musculus* (ratón) y en células HeLa, dando como resultados que la clona identificada como EH-26 incrementó la virulencia de *Escherichia coli* y *P. aeruginosa* en los diferentes modelos utilizados, así como la toxicidad de las líneas celulares (Fig. 8).

El análisis de secuenciación del DNA de la clona EH-26 indicó que el plásmido pEH26 contiene los *orf*s 92, 93 y 94 del plásmido pUM505. Interesantemente, el *orf* 92 codifica a la proteína ChrB, que forma parte del operón chr de pUM505. Del cual forma parte el gen *chrA* de resistencia a cromato. El *orf* 93 codifica a la proteína TnpR (Resolvasa/

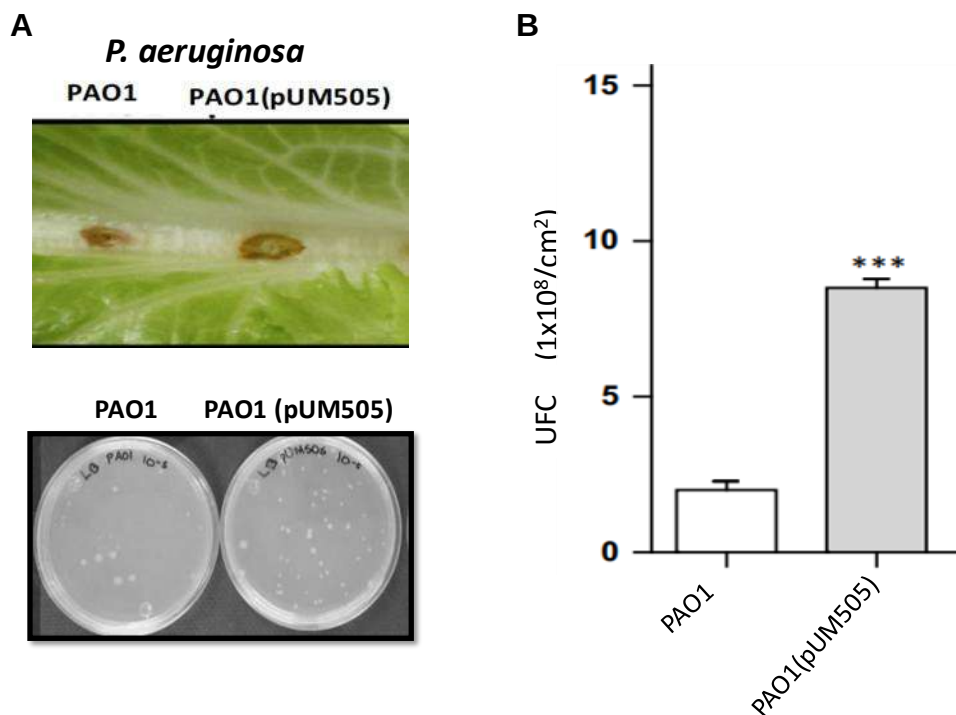


Figura 7. Virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* en hoja de lechuga. Las hojas de lechuga fueron inoculadas con 1×10^6 ($\pm 1 \times 10^4$) UFC de las bacterias indicadas. **A.** Área de lesión de la nervadura de la hoja de lechuga a los 4 días postinoculación de las cepas. **B.** Cuantificación de las UFC del área de lesión de las hojas de lechuga. Los datos corresponden a las medias de seis experimentos independientes y se muestra la desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (PAO1) están indicadas por *** $p < 0.001$ (prueba de Tukey) (Modificado de Rodríguez-Andrade y col., 2016).

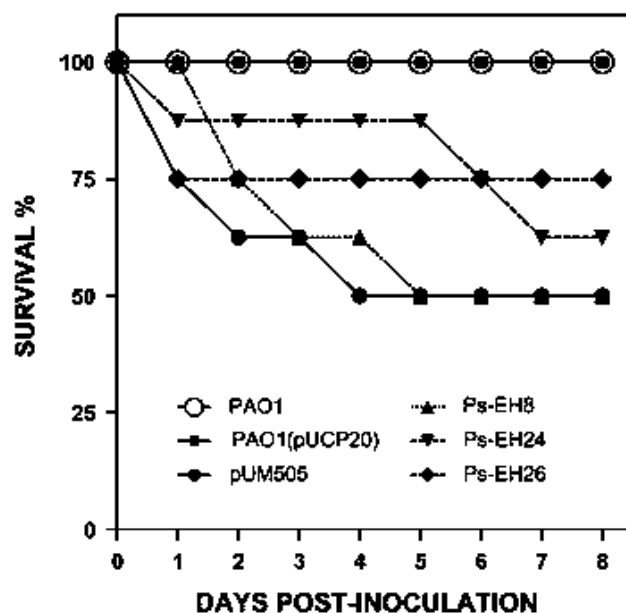


Figura 8. Virulencia de las clonas con plásmidos recombinantes del plásmido pUM505 en modelo murino. La virulencia de las clonas se determinó usando ratones (BALB/C) inoculando 3×10^6 ($\pm 1 \times 10^4$) UFC de las clonas mediante administración intravenosa (i.v.). La supervivencia de los ratones se monitoreó diariamente durante 8 días. Los gráficos muestran los datos promedio obtenidos de tres experimentos independientes, expresados como el porcentaje de ratones sobrevivientes después de la infección en cada grupo experimental (Tomado de Rodríguez-Andrade y col., 2016).

Integrasa), proteínas que actúan en la transposición de DNA, mientras que el *orf* 94 codifica una proteína del tipo transposasa TnpA, una enzima que es clave para la transposición y el movimiento de elementos genéticos conocidos como transposones (Ramírez-Díaz y col., 2011). Estos datos sugirieron que alguno de los genes del plásmido pEH26 era el responsable del incremento de la resistencia a cromato.

4.4.2 Virulencia conferida por el operón de resistencia a cromato *chr*

El gen *chrB* identificado en la clona EH-26, como fue descrito anteriormente forma parte del operón *chr* de resistencia a cromato en conjunto con los genes *chrA* y *chrC*. El estudio de la participación de los genes *chr* en la virulencia mostraron que *P. aeruginosa* PAO1 con el gen *chrA* aumentó su virulencia en comparación con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 o con las transformantes con los genes *chrB* y *chrC* (Fig. 9), sugiriendo que el gen *chrA* además de conferir resistencia a cromato, participa en la virulencia de la bacteria. Por lo que resultó importante determinar si otras proteínas Chr también participan en la virulencia de las bacterias.

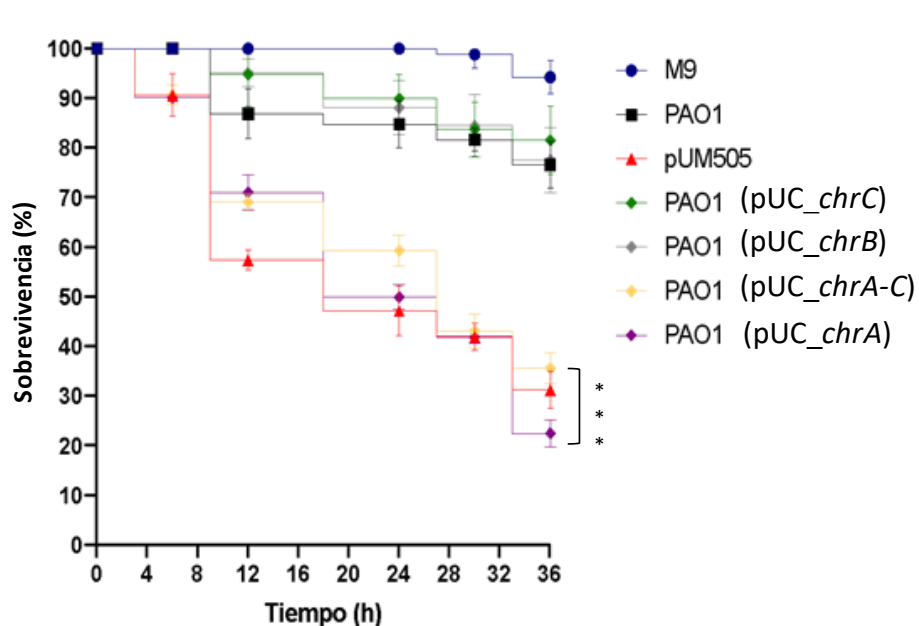


Figura 9. Virulencia conferida por los genes del operón *chr*. Los cultivos de las cepas se crecieron en medio M9 durante 18 h a 37 °C en agitación constante. Se colocaron 20 nematodos de *Caenorhabditis elegans* por pocillo en presencia de $1 \times 10^5 (\pm 1 \times 10^4)$ UFC. Se muestra el promedio de tres experimentos independientes. N=3 (por duplicado), las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$.

5 Justificación

La proteína ChrA de expulsión a cromato, se encuentra ampliamente distribuida en los tres dominios de la vida y forma parte la súperfamilia ancestral CHR, lo que indica que posee un papel importante a nivel celular. La proteína ChrA del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*, además de conferir resistencia a cromato, en ausencia de este ion tóxico, también es capaz de incrementar la virulencia. Por lo que evaluar la función de proteínas homólogas a ChrA de pUM505, pertenecientes a las familias SCHR y LCHR que confiere resistencia a cromato, es importante para determinar si funcionan como sistema de expulsión de factores de virulencia.

6 Hipótesis

Las proteínas ChrA de la superfamilia CHR participan en la virulencia de las bacterias.

7 Objetivos

7.1 Objetivo general

Determinar si las proteínas ChrA de la superfamilia CHR participan en la virulencia, a través de la expulsión de moléculas.

7.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el papel de ChrA2 de *Burkholderia xenovorans* LB400 de la familia LCHR en la virulencia.
2. Evaluar el papel del par de proteínas Chr3N y Chr3C de *Bacillus subtilis* de la familia SCHR en la virulencia.
3. Determinar características funcionales y estructurales de la(s) molécula(s) asociada(s) a la virulencia en presencia de las proteínas ChrA.

8 Estrategia experimental

OBJETIVO I y II

Transferir los genes *chrA2* y el par *chr3N-Ca* a *P. aeruginosa*



Caracterizar a nivel molecular las transformantes



Realizar ensayos de virulencia con el modelo *C. elegans*

OBJETIVO

Determinar la secreción de factores de virulencia



Cuantificar la producción de pioverdina y piocianina en el medio extracelular



Determinar la producción de biopelícula



Determinar la naturaleza y tamaño de la molécula(s) secretada(s) por proteínas ChrA implicadas en la

9 Materiales

9.1 Reactivos y medios de cultivo

Los medios de cultivo y componentes obtenidos de los laboratorios Bioxon de México S.A.

- Dicromato de potasio (K_2CrO_4): de los laboratorios Merck.
- Caldo Nutritivo (CN): Extracto de carne 3.0 g, peptona de carne 5.0 g y agua destilada cuanto baste para 1L
- Medio mínimo (M9): sales minerales M9 (Sigma), glucosa 20 mM, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 mM y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mM (Sambrook y col., 1989).
- Medio Luria Bertani (LB): NaCl 1%, peptona de caseína 1% y extracto de levadura 0.5%.
- Agar Luria Bertani (LB): NaCl 1%, peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y agar bacteriológico 1.5%
- 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 bacteriológico. Adicionar 1000 μ L de colesterol.

9.2 Cepas

- *P. aeruginosa* PAO1. Cepa de referencia cuyo genoma esta secuenciado (Colección de la Dra. Iglewski's) (Li y col., 2007) Usada como cepa control y como receptora de los plásmidos pUC_*chrA*, pUC_*chrA2* y pUC_*chr3NC*.
- *E. coli* JM101. Usada como cepa control y como receptora de los plásmidos pUC_*chrA*, pUC_*chrA2* y pUC_*chr3NC*.
- Mutante de *P. aeruginosa lasI/rhlI*. Cepa donada por el D.C. Campos García Jesús Tc^R. Se empleó como receptora de los plásmidos pUC_*chrA*, pUC_*chrA2* y pUC_*chr3NC*.

10 Métodos

10.1 Aislamiento del DNA plasmídico mediante lisis alcalina

Para el aislamiento se usó el método modificado de Birnrom y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1981, se llevó a cabo por el siguiente protocolo:

Se obtuvo un cultivo bacteriano en 2 mL de medio LB durante la noche a 37 °C con agitación constante, se llevó a centrifugar a 12 000 revoluciones por minuto (r.p.m) por 2 minutos (min.). El sobrenadante fue desechado, y la pastilla celular fue resuspendida en 100 µL de STE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM). Se agregó 20 µL de lisozima (20 mg/mL), se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min. a 37 °C. Una vez pasado el tiempo se agregó 300 µL de una solución de lisis preparada al momento (100 µL SDS al 10%, 100 µL de NaOH 2 N y H₂O ultrapura estéril cuanto baste para 1000 µL c.b.p.), se mezcló por inversión y se dejó reposar en hielo durante 10 min. Se agregó acetato de potasio al 3 M a un pH: 4.8, se volvió a colocar en hielo durante 10 min, para después centrifugar 10 min. a 12 000 r.p.m., pasado el tiempo el sobrenadante fue obtenido en un tubo eppendorf nuevo y los restos celulares fueron desechados. Se agregó 500 µL de una solución de fenol/cloroformo, se mezcló ligeramente y se llevó a centrifugar 10 min. a 12 000 r.p.m., para posteriormente recuperar la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo y añadir ~ 1 mL de etanol absoluto y se incubó a – 80 °C durante 30 min. Al cabo de este tiempo, se centrifugó 10 min a 12 000 r.p.m. para desechar el sobrenadante. Los restos sólidos fueron lavados con etanol al 70 % y centrifugados a 12 000 r.p.m. por 2 min., los lavados fueron llevados a cabo 2 veces. Se descartó y volatilizó el etanol restante, se añadió 50 µL de H₂O ultrapura estéril.

Se almacenó a - 20 °C hasta su análisis por separación electroforética en un gel de agarosa al 1 %.

10.2 Extracción de DNA por calor

Se pusieron a incubar tubos con 2 mL de medio LB o CN de las cepas de interés, con el antibiótico correspondiente cuando fue necesario, durante 18 – 22 h a 37 °C con agitación constante. Al día siguiente los tubos cultivados fueron centrifugados a 12 000 r.p.m. durante 2 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla celular fue resuspendida en 100 µL de agua ultrapura estéril. La pastilla resuspendida se llevó a baño María con agua hirviendo durante 5 min., transcurrido el tiempo se transfirió a hielo por otros 5 min. El DNA obtenido se almacenó a - 20 °C hasta su uso.

10.3 PCR

Los oligonucleótidos usados habían sido previamente diseñados en el grupo de trabajo y amplifican una región interna de los genes (Tabla 1). La mezcla de reacción se conformó por DNA (~ 100 ng), oligonucleótidos directo y reverso (10 picoM) (Tabla 2), y 5 µL de la mezcla Master Mix marca Promega (*Taq* polimeraza, dNTPs, MgCl₂ y amortiguador) en un volumen final de 10 µL. El termociclador usado fue MultiGene™ OPTIMAX, con las condiciones descritas (Tabla 3).

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes *chr*.

No. oligo	Nombre	Características
16	ChrA + 1	Región codificante de <i>chrA</i> flanqueada por sitio <i>Bam</i> HI
31	Oligo 4	Oligo inverso para obtener el fragmento flanqueante de 636 pb de <i>chrA</i> , tomando como inicio el oligo +1
A-1	RT-PCR ChrASn_D	Oligo directo para amplificar el gen <i>chr3NC</i>
A-4	RT-PCR ChrASn_R	Oligo reverso para amplificar el gen <i>chr3NC</i>
Mau-7	Bxe DLCHR2	Oligo directo para amplificar un fragmento interno de ~350 pb del gen <i>chrA2</i> . Oligo para RT.
Mau-8	Bxe RLCHR2	Oligo reverso para amplificar un fragmento interno de ~350 pb del gen <i>chrA2</i>

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos usados.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')
ChrA + 1	GGAGAGGATCCATGAGCGTTGCGAATG
Oligo 4	CCTGTCTAGAAACGACCGCTTCCACAA
RT-PCR ChrASn_D	TCTGCCTACATGTCTTGCGATGGT
RT-PCR ChrASn_R	GACAGCGTCATGCCTTTGATGACA
Bxe DLCHR2	GTCAGCACCTGGAAGCTCTCTAC
Bxe RLCHR2	GTACTCCTTGACCACTCCGC

Tabla 3. Condiciones para la amplificación de los genes *chr*.

No. oligo	Desnaturaliza ción inicial	Desnaturaliza ción	Alineamiento	Extensión	Extensión final
16 y 31	95 °C x 5 min	95 °C x 30 seg	60 °C x 30 seg	72 °C x 1 min	72 °C x 5 min
A-1 y A-4	95 °C x 2 min	95 °C x 40 seg	57 °C x 30 seg	72 °C x 2 min	72 °C x 5 min
Mau-7 y Mau-8	95 °C x 1 min	95 °C x 30 seg	54 °C x 30 seg	72 °C x 1 min	72 °C x 5 min

10.4 Electroforesis en gel de agarosa

El producto de lisis alcalina o de PCR fue sometido a un corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1 % (sigma), en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40mM y EDTA 1 mM). El gel preparado se colocó en una cámara de electroforesis con el amortiguador. La muestra de DNA se mezcló con 1 µL de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25 %, xileno cianol FF 0.25 % y glicerol en agua 30%) y fue colocada en los pocillos del gel, al igual que los marcadores de peso molecular (Llambda *Hind*III o GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder). La cámara se conectó a la fuente de poder (marca E-C Apparatus Corporation modelo EC452) con una corriente eléctrica de 120 voltios durante 40 a 50 min. Una vez concluida la electroforesis, el gel se tiñó con bromuro de etidio al 0.001 % durante 45 min. Para poder observar las bandas, el gel se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta (marca UV-Products Inc.).

10.5 Transformación por el método de electroporación

Se incubó una placa con la cepa a la cual se deseaba transformar durante 18 h, al día siguiente se recuperaron las células en 500 µL de H₂O ultrapura estéril y se centrifugó a 12 000 r.p.m., se desechó el sobrenadante y se lavaron 2 veces las células. Para al final resuspender en 500 µL de H₂O ultrapura estéril. Donde 100 µL de células fueron mezclados con una concentración de 10 ng del DNA plasmídico y una vez mezclado, se colocaron en celdas de electroporación, a las cuales se les dio un pulso eléctrico de 1.8 voltios durante 4 milisegundos (ms). Inmediatamente fueron recuperados de la celda y colocados en tubos de vidrio con 1 mL de medio CN o LB, se llevaron a incubar durante 2 h a 37 °C con agitación constante. Posterior a esto, se recuperó en tubos eppendorf y se centrifugó durante 2 min. a 12 000 r.p.m., se desechó el

sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular en 100 µL de medio, los cuales fueron tomados y plaqueados en agar LB adicionado con antibiótico (ampicilina o carbenicilina). Las placas se llevaron a incubar durante 18 a 22 h y las colonias obtenidas fueron recuperadas en placas de agar y en tubo con medio líquido para su posterior caracterización.

10.6 Ensayos de resistencia a cromato

Se crecieron tubos de cultivo bacteriano durante la noche a 37 °C con agitación constante, posteriormente 40 µL del inóculo (ajustado a una densidad óptica (D.O.) de 0.8 D.O. _{590 nm}.) fueron inoculados en tubos con medio líquido (M9 o CN) suplementados con concentraciones crecientes de dicromato de potasio. Los tubos se llevaron a incubar durante 18 – 22 h a 37 °C con agitación constante. La resistencia fue determinada mediante la medición de absorbencia en un espectrofotómetro (marca Spectronic 21, Miltron Roy) a 590 nm.

10.7 Ensayos de virulencia de la cepa y toxicidad de los sobrenadantes en el modelo del nemátodo *C. elegans*

Se emplearon nemátodos crecidos con anterioridad en medio NGM (sembrado con *E. coli* OP50) durante 4 a 5 días a 12 °C, posteriormente se crecieron preinóculos de las cepas de interés en presencia de antibiótico y con o sin adición de otros compuestos (según los requerimientos para cada experimento) durante la noche en medio M9 o CN con agitación constante a 37 °C. Para los ensayos de virulencia se colocó 1.5 µL equivalente a 1×10^5 ($\pm 1 \times 10^4$) UFC de la muestra en tubos eppendorf y se adicionó medio M9 hasta un volumen final de 1 000 µL, se mezcló con ayuda de vortex y se

tomaron 100 µL para colocarlos en placas de 96 pocillos, se añadió 100 µL de medio M9 y se colocaron de 15 – 20 nemátodos adultos por pocillo. Algunos sobrenadantes recibieron tratamientos, los cuales serán indicados en la tabla 4. Se cuantificó en porcentaje de sobrevivencia de los nematodos cada 6 h durante 42 h.

10.8 Obtención del sobrenadante total

El sobrenadante total se obtuvo de los cultivos bacterianos de las cepas de *P. aeruginosa* de interés, estos fueron crecidos durante 18 h a 37 °C con agitación constante, en medio M9 y fue adicionado un tratamiento adicional cuando fue necesario. Además de que fueron ajustados a una densidad óptica de 0.8 D.O. _{590 nm} con una concentración de $1 \times 10^5 (\pm 1 \times 10^4)$ UFC con 40 µL del inóculo en tubos de 4 mL.

Una vez obtenidos los cultivos bacterianos en tubos eppendorf, se centrifugaron durante 5 min a 12 000 r.p.m. Después se procedió a recuperar el sobrenadante, del cual se eliminaron las células por medio de filtración, el tamaño del poro del papel filtro usado fue de 0.45 µm. Posteriormente, del sobrenadante filtrado se tomó 50 – 80 µL y se transfirieron a un tubo de medio LB de 2 mL para realizar la prueba de esterilidad. Transcurridas las 18 h, si la prueba de esterilidad era negativa el sobrenadante estaba listo para su uso, si el tubo mostraba crecimiento el sobrenadante fue filtrado de nuevo.

10.9 Cuantificación de producción de peróxido de hidrógeno

Se crecieron cultivos bacterianos de las cepas de interés en medio CN con el antibiótico correspondiente durante 18 h a 37 °C con agitación constante, transcurrido el tiempo se ajustó el crecimiento a una D.O. _{590 nm} de 0.8 para inocular 4 mL de medio M9 y se dejaron crecer nuevamente por 18 h. Después se centrifugó todo el inóculo a 12 000 r.p.m. por

Tabla 4. Tratamientos de los sobrenadantes.

Tratamiento	Concentración	Condiciones
Proteasa	15 µg	2 h, temperatura ambiente
Calor	NA	2 h o 5 min, T (°C) = 90, 80, 60 o 40

2 min y se desechó el sobrenadante, la pastilla fue resuspendida en 800 µL de una solución de Yoduro de potasio (Yoduro de potasio 0.5 M, fosfato de potasio monobásico 2.5 mM y ácido tricloroacético al 0.025%), se llevó a refrigeración durante 10 min y se centrifugó 15 min a 12 000 r.p.m. a 4 °C, para después leer las absorbencias a 350 nm.

10.10 Determinación de la tasa de consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno de las bacterias se llevó a cabo a partir de cultivos crecidos en medio mínimo M9 a 37°C durante 18 h. La respiración se midió a 28 °C con un oxímetro marca Oxytherm (Hansatech Instruments Ltd., Norflok, Inglaterra). Los resultados se expresaron como nanomoles (nmol) de oxígeno consumido por mL por segundo.

10.11 Análisis de RT-qPCR

Las muestras de RNA de las cepas de interés fueron obtenidas de las células bacterianas incubadas durante 22 h a 37 °C con agitación constante en medio M9. Las muestras de RNA fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (SamartSoec Plus Bio-Red, Hercules, C.A.) a D.O._{260 nm} y D.O._{280 nm}, dichas absorbancias indican la presencia de ácidos nucleicos y proteínas, respectivamente. Se evaluó la relación A_{260}/A_{280} , en donde la relación ≥ 1.90 a 1.0, indica una cantidad optima del ácido nucleico. Las muestras de RNA total cuyo valor de relación resultó < 1.8 fueron descartadas para análisis de RT-qPCR. La amplificación y detección de los genes se realizó usando una sonda de hidrólisis que emplea la actividad 5' exonucleasa, de la DNA polimerasa. Los oligonucleótidos y las sondas fueron diseñadas mediante la herramienta bioinformática disponible por BioSearch Technologies (<https://www.biosearchtech.com/>) (Tabla. 4) La

RT-qPCR se realizó en el sistema LightCycler480 II (Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, C.A.), usando el kit SuperScript III Platinum One-step RT-qPCR (Invitrogen, Carlsband, C.A.). Donde cada 25 μ L de volumen de reacción contenía 5 μ L de RNA templado [100 μ g], 0.5 μ L de mezcla de las enzimas retrotranscriptasa y DNA polimerasa, 12.5 μ L de mezcla de reacción al 2 X, 0.5 μ L (10 μ M) de oligonucleótido directo y de oligonucleótido reverso, 0.5 μ L (5 μ M) de la sonda de hidrolisis y 5.5 μ L de agua libre de nucleasas. La mezcla de reacción fue preparada en una campana de seguridad UVP. La RT-qPCR se inició por la adición de la retrotranscriptasa reversa (50°C/ 30 min.) y la desnaturalización inicial (90°C/5 min.), seguida por 45 ciclos de amplificación a 95 °C/ 15 seg, 60°C/ 30 seg, 72°C/ 30 seg. Las señales de fluorescencia fueron destacadas a cada ciclo de amplificación a 60 °C. Las curvas obtenidas de la amplificación fueron analizadas a D.O._{530 nm}, en cada experimento fueron incluidos genes de expresión constitutiva como controles positivos y agua como control negativo (Tabla 5) (Montoya-Montoya, 2024; Valle-Maldonado, 2015). Las muestras fueron procesadas en colaboración con el Laboratorio de Salud Pública de Michoacán. centro estatal de transfusión sanguínea.

Tabla 4. Sondas utilizadas para RT-qPCR

Gen	Nombre sonda	Secuencia Sonda
16S	P-P16S	TACCTGGCCTTGACATGCTGAGA
<i>chrA</i>	PsChrA_P1	CGGCCTTTGCGTTCTCGCTGAT
<i>chr3NC</i>	Bs chr3N_P1	TGTGTTAAGCCATTCAGCAATTGTTGCA
<i>chrA2</i>	Bx ChrA2_P1	CCAATGACAGCGGAACTCACGCC

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizadas para RT-qPCR.

Gen	Nombre oligos	Secuencia Oligos
16S	OD-P16S	TCGAAGCAACGCGAAGAAC
	OR-P16S	CGAAGGCACCAATCCATCTCT
<i>chrA</i>	PsChrA_F	TGACGGTGGGTGTCTTTCTTC
	PsChrA_R	GCGTGCAGCCGTTTGTCT
<i>chr3NC</i>	Bs chr3N_F	GCGATGGTGGGCTTGTTTG
	Bs chr3N_R	TGACGGCACCAATCATACC
<i>chrA2</i>	Bx ChrA2_F	CAGGTGCTGACAGCAATGATC
	Bx ChrA2_R	GCTGCCCTCGTTTCTGATG

10.12 Cuantificación de factores de virulencia

10.12.1 Cuantificación de la producción de piocianina

Se crecieron los cultivos bacterianos de las cepas a analizar en medio CN o M9, durante 18 h a 37 °C con agitación constante, se adicionó el cultivo bacteriano ajustando a una D.O. de 0.05 nm. en matraces de M9 o CN, los cuales se incubaron durante 48 h a 37 °C con agitación constante, se obtuvo el sobrenadante por medio de centrifugación durante 10 min. a 10 000 r.p.m., se añadió un volumen de cloroformo y se agitó vigorosamente, para después dejar reposar hasta observar la separación de fases. La fase orgánica fue recuperada, se añadió HCl 0.2 N y se llevó a agitación constante a temperatura ambiente durante 30 min. Por último, se midió la absorbencia a 520 nm.

10.12.2 Cuantificación de la producción de Biofilm

Se crecieron los cultivos bacterianos de las cepas a analizar en medio CN o M9, durante 18 h a 37 °C con agitación constante, se diluyó el cultivo 1:50 en medio M9 o CN y se tomaron 200 µL de la dilución para colocarlo en placas de 96 pocillos y se dejó incubar por 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se leyeron las absorbancias una D.O. 590 nm y se desechó el sobrenadante, se realizaron 3 lavados con agua destilada. La biopelícula se tiñó con cristal violeta al 1 % y se llevó a incubar a 37 °C durante 20 min., se realizaron 3 lavados con agua destilada y se destiñó la biopelícula agregando 200 µL de metanol. Se leyó la absorbencia a 520 nm.

10.12.3 Cuantificación de producción de pioverdina

Se incubaron cultivos bacterianos en 4 mL de medio M9 durante 22 h, a 37 °C, con agitación constante y ajustados a una densidad óptica de 0.8 D.O. 590 nm con 40 µL del inóculo. Pasado la incubación, se centrifugó 1 mL del inóculo a 12 000 r.p.m. durante

5 min, para obtener el sobrenadante libre de células. La producción de pioverdina se determinó en el sobrenadante, mediante la absorbencia medida a 405 nm y su coeficiente de extinción a esa densidad óptica.

10.12.4 Cuantificación de proteasa

Se incubaron los cultivos bacterianos de interés en 4 mL de medio M9 durante 22 h, a 37 °C con agitación constante y ajustados a D.O. $_{590\text{ nm}}$ 0.8 con 40 μL del inóculo. Transcurrido el tiempo, el cultivo se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 2 min. y 200 μL de sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo, al cual se le agregó 800 μL de buffer de caseína (caseína al 15 %, en buffer de borato 20 mM, pH 9.0), se incubó a 50 °C durante 20 min. Posteriormente la reacción se detuvo agregando ácido tricloroacético (10 %). Por último, se midió D.O. $_{450\text{ nm}}$, para cuantificar la cantidad de enzima en las muestras, empleando una curva de concentraciones conocidas de proteína (BSA).

10.12.5 Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina

Crece los cultivos de interés en CN durante 18 h a 37 °C en agitación constante. Al día siguiente los preinóculos fueron ajustados a una D.O. de 0.8 en un volumen final de 40 μL y se incubaron con las condiciones previamente descritas. Pasado 18 h, se determinó la densidad óptica de los cultivos a 590 nm, para posteriormente centrifugar 1 mL de los cultivos bacterianos, desechar el sobrenadante y resuspender las células en 1 mL de buffer de ensayo (Tris-HCl 1 M pH 8.0 y ZnCl_2 1 mM). Las células fueron permeabilizadas con 20 μL de cloroformo y 15 μL de SDS (0.1 %), las cuales fueron incubadas durante 5 min. a 37°C. Para medir la velocidad de hidrólisis generada por actividad de fosfatasa fue adicionado 200 μL de p-nitrofenil fosfato (pNPPP, 0.4% en soln. Tris-HCl 100 mM pH 10.0), las muestras se incubaron durante 4 h a 37 °C.

Transcurrido el tiempo la reacción se detuvo con la adición de 120 µL de EDTA 80 mM, pH 8.0 y K₂HPO₄ 2 M. Posteriormente se determinó la densidad óptica a 420 nm y 550 nm. Los resultados obtenidos se procesaron mediante la siguiente ecuación, calculando las Unidades de Fosfatasa Alcalina (UFA).

$$UFA = \frac{(1000 * D.O._{420}) - (1.75 * D.O._{550})}{t * V * D.O._{590}}$$

t = tiempo de reacción (h)

V = volumen de cultivo usado en el ensayo (mL)

D.O. = densidad óptica medida a 420, 550, o 590 nm

10.13 Cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante

Para llevar a cabo el fraccionamiento molecular de las proteínas de los sobrenadantes, se obtuvo el sobrenadante total de las cepas crecidas durante 22 h a 37 °C con agitación constante y congelado a 4 °C hasta su posterior uso. Se realizaron fraccionamientos con columnas de punto de corte de: 3 y 30 kDa, para los cuales se llevaron a cabo procedimientos diferentes

10.13.1 Columna de punto de corte de 3 kDa

Se obtuvo el sobrenadante estéril, el cual fue colocado en la columna de Amicon 3 kDa (Millipore), posteriormente se centrifugó a 4 500 g durante 1 h, el proceso de centrifugado se repitió de ser necesario y, se obtuvieron dos fracciones una > 3 y una < 3 kDa, las fracciones fueron almacenadas para su posterior uso en los ensayos de toxicidad.

10.13.2 Columna de punto de corte 30 kDa

Se obtuvo el sobrenadante estéril, el cual fue colocado en la columna de Microcon 30 kDa (Millipore), posteriormente se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 5 min, el proceso de centrifugado se repitió de ser necesario, se obtuvieron dos fracciones una > 30 y una < 30 kDa, las fracciones obtenidas fueron empleadas para los ensayos de toxicidad.

11 Resultados

11.1 Objetivo 1 y 2

11.1.1 Transferencia de los genes *chr* a cepas de *P. aeruginosa* PAO1

Para evaluar el nivel de virulencia de las cepas con la presencia de los genes de resistencia a cromato, los genes pertenecientes a *B. subtilis* 168 (el par *chr3NC*) y *B. xenovorans* LB400 (*chrA2*), fueron transferidos por electroporación a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, donde fue evaluado previamente la participación del gen *chrA* del plásmido pUM505. La caracterización molecular de las transformantes con los plásmidos pUC_*chrA*, pUC_*chr3NC* y pUC_*chrA2* se realizó por aislamiento plasmidico y PCR. El análisis por electroforesis mostró bandas de DNA del tamaño correspondiente a la presencia de los plásmidos pUC_*chrA*, pUC_*chr3NC* y pUC_*chrA2* en las transformantes (Fig. 10 A), así como bandas de tamaño esperado de la amplificación por PCR de los genes *chr* en dichos plásmidos (Fig. 10 B). Estos resultados confirmaron la transferencia de los plásmidos con los genes *chr* en *P. aeruginosa* PAO1.

11.1.2 Susceptibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes de resistencia a cromato

Para analizar si los genes *chrA2* y *chr3NC* confieren resistencia a cromato (como había sido previamente reportado) se realizaron curvas de susceptibilidad a cromato (K₂CrO₄) en medio CN y M9. Se usó como control a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1.

En las curvas de crecimiento realizadas, tanto en medio CN (Fig. 11A) como en M9 (Fig. 11B), se observó que la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 no posee resistencia a cromato, además se observó que la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_*chr3NC*), no

confiere resistencia a cromato y se comporta igual que el control. Mientras que la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_*chrA2*) si confiere resistencia a cromato.

11.1.3 Transferencia de los plásmidos con los genes *chr* a cepas de *E. coli* JM101

Los plásmidos recombinantes con los genes *chrA*, *chr3NC* y *chrA2* fueron transferidos a la cepa de *E. coli* JM101 y caracterizadas de forma molecular.

11.1.4 Susceptibilidad de las cepas de *E. coli* JM101 con los genes de resistencia a cromato

Para evaluar la participación de los genes *chrA*, *chr3NC* y *chrA2* en la resistencia a cromato en este fondo genético se realizaron curvas de susceptibilidad a este ion, en medio CN y medio mínimo M9. Los resultados mostraron que los genes *chr* no son capaces de incrementar la resistencia a cromato en este fondo genético (Fig. 12 A y 12 B). Las cepas transformadas con los plásmidos recombinantes con los genes *chr* mostraron la misma susceptibilidad a cromato que la cepa de *E. coli* JM101.

11.1.5 Ensayo de toxicidad en *C. elegans* de los sobrenadantes

Para analizar la toxicidad de los sobrenadantes en *C. elegans*, se realizaron ensayos con diferentes diluciones del sobrenadante de los cultivos de las cepas transformantes de *P. aeruginosa* con los genes *chr* (Fig.13). Se observó que tanto el sobrenadante de *P. aeruginosa* PAO1 como el de *P. aeruginosa* (pUC_*chrA*) son tóxicos para el nematodo, pues disminuyen su sobrevivencia. Además, se observó que la toxicidad de los sobrenadantes es dependiente de la concentración, la sobrevivencia de los nematodos aumenta al emplear un sobrenadante más diluido. El mayor efecto se observó con los sobrenadantes totales, *P. aeruginosa* PAO1 generó una sobrevivencia del 20% de los nematodos, mientras que el sobrenadante de *P. aeruginosa* (pUC_*chrA*) generó una

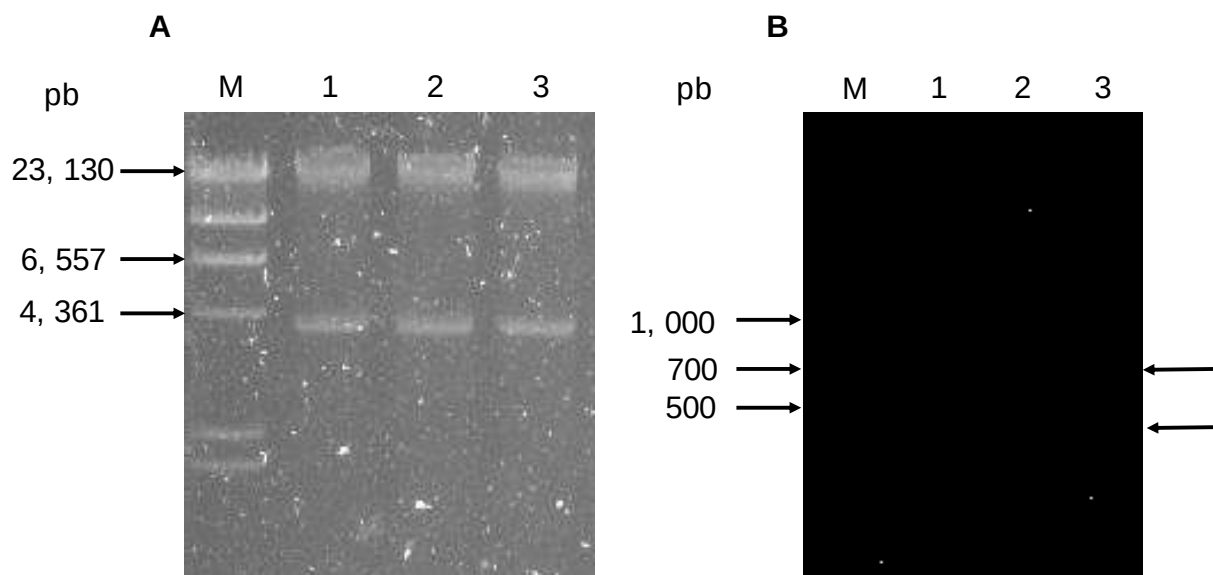


Figura 10. Caracterización molecular de las cepas transformadas de *P. aeruginosa* PAO1. Geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio a 0.5 µg/mL. **A.** DNA plasmídico, carriles: M. Marcador Lambda DNA/*Hind*III, 1. Plásmido pUC_*chrA*, 2. pUC_*chr3NC* y 3. pUC_*chrA2*. **B.** Genes de resistencia a cromato amplificados mediante PCR, carriles: M. Marcador GeneRuler 1kb Plus DNA., Producto de PCR (octubre 2023) de: 1. gen *chrA*, 2. gen *chr3NC* y 3. gen *chrA2*. Con flechas señalados los productos de PCR.

sobrevivencia de 0%. Sugiriendo que el gen *chrA* de pUM505 secreta algún componente que aumenta la virulencia. Aunado a esto, se observó que la dilución más alta empleada (1:300) aun genera toxicidad siendo 80% la sobrevivencia de los nematodos incubados con el sobrenadante diluido de *P. aeruginosa* PAO1, mientras que el sobrenadante diluido de *P. aeruginosa* (pUC_*chrA*) generó solo 30% de sobrevivencia, confirmando la suposición de que el gen *chrA* de pUM505 secreta algún componente que aumenta la virulencia.

11.1.6 Ensayos de determinación de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes

Para evaluar la participación de las proteínas Chr pertenecientes a las familias Schr (Chr3NC) y Lchr en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 se realizaron ensayos de virulencia y ensayos de toxicidad con los sobrenadantes obtenidos de las transformantes con estos genes.

Se observó que los nematodos incubados con los cultivos de *P. aeruginosa* (pUC_*chrA2*) y *P. aeruginosa* (pUC_*chr3NC*) disminuyeron la sobrevivencia de los nematodos hasta cerca de 54%, mientras que antes de *P. aeruginosa* PAO1 (cepa control) confirió 20% de sobrevivencia (Fig.14). Lo que indica que las proteínas Chr, además de poseer un papel importante en la resistencia a cromato, participa en el aumento de virulencia. Interesantemente, aunque las proteínas Chr3NC no son capaces de conferir un aumento en la resistencia a cromato en *P. aeruginosa* PAO1, incrementa la virulencia de la bacteria.

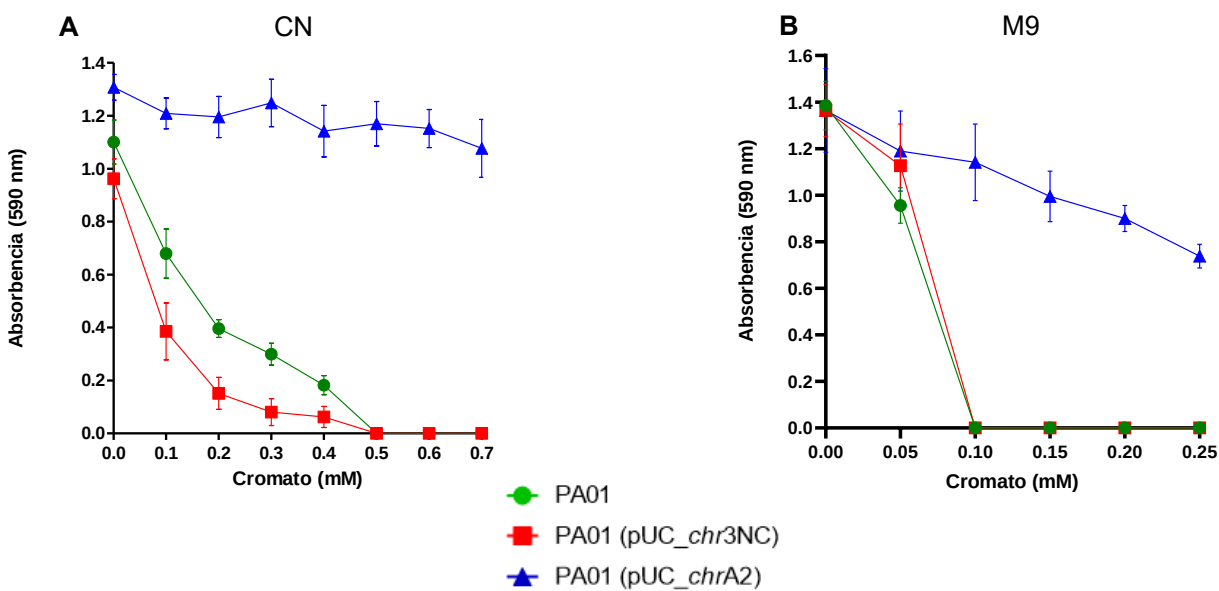


Figura 11. Susceptibilidad a cromato de las bacterias de *P. aeruginosa* con los genes *chr3NC* y *chrA2*. Las curvas se obtuvieron de cultivos crecidos a 37°C con agitación constante y con concentraciones crecientes de K_2CrO_4 **A.** CN durante 18 h y **B.** en medio M9 durante 22 h. Se midió la absorbencia a D.O. 590nm. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar.

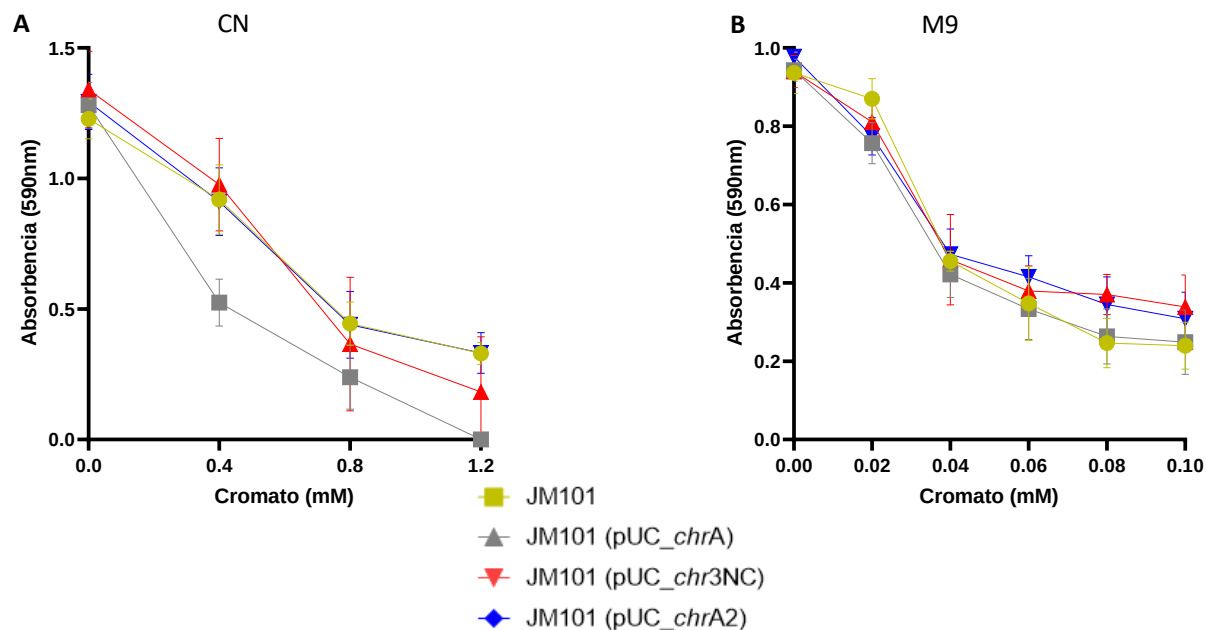


Figura 12. Susceptibilidad a cromato de la cepa de *E. coli* JM101 con los genes de resistencia a cromato. Los datos de las curvas analizadas se obtuvieron de cultivos bacterianos crecidos a 37 °C con agitación constante, a diferentes concentraciones de K_2CrO_4 en **A.** en medio CN durante 18 h y **B.** en medio M9 durante 22 h, Y se midió la absorbencia a D.O. 590nm. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar.

Debido que las proteínas Chr son proteínas de membrana que expulsan cromato (Álvarez-Álvarez y col., 1999) se decidió evaluar la toxicidad del sobrenadante obtenido de las bacterias con los genes *chr*. Se realizaron ensayos de toxicidad de los sobrenadantes en el modelo de *C. elegans*.

Se observó que los sobrenadantes obtenidos de las cepas con los genes *chr* aumentan su toxicidad, respecto a la cepa control (*P. aeruginosa* PAO1) (Fig. 15). Los sobrenadantes de *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_*chrA2*) y *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_*chr3NC*), disminuyeron el porcentaje de sobrevivencia de *C. elegans* hasta un 50% a las 42 h post-incubación en comparación con el 20% generado por *P. aeruginosa* PAO1.

Lo que sugiere que las células bacterianas con los genes *chr* secretan al exterior celular una o unas moléculas tóxicas.

Adicionalmente se determinó la participación en la virulencia conferida por las proteínas Chr en *E. coli* JM101. Se observó que los genes *chrA*, *chr3NC* y *chrA2* no aumentan la virulencia de los cultivos (Fig. 16) y tampoco aumenta la toxicidad de sus sobrenadantes (Fig. 17) en este fondo genético.

11.1.7 Efecto del sulfato (SO_4^-) en la resistencia a cromato de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr3NC* y *chrA2*

Dado que previamente fue descrito que la concentración de sulfato en el medio de cultivo modifica la resistencia a cromato conferido por las proteínas Chr se evaluó la susceptibilidad a cromato de las cepas con los genes *chr* en presencia de baja (0.2 mM) o alta (6 mM) concentración de sulfato (MgSO_4) en el medio M9.

Los resultados mostraron que la disminución de concentración de sulfato en el medio generó la disminución de la resistencia a cromato de todas las cepas en comparación con la concentración estándar de sulfato (2 mM) (Fig. 18 A y B). Por otro lado, el aumento de la concentración de sulfato, aumentó la resistencia a cromato de todas las cepas en comparación con la concentración baja o estándar de sulfato (Fig. 18 B y C). Aunque las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_chr3NC) no son resistentes a cromato, se observa que estas cepas crecen a mayores concentraciones del metal, comparada con las curvas realizadas de concentraciones estándar de sulfato de magnesio.

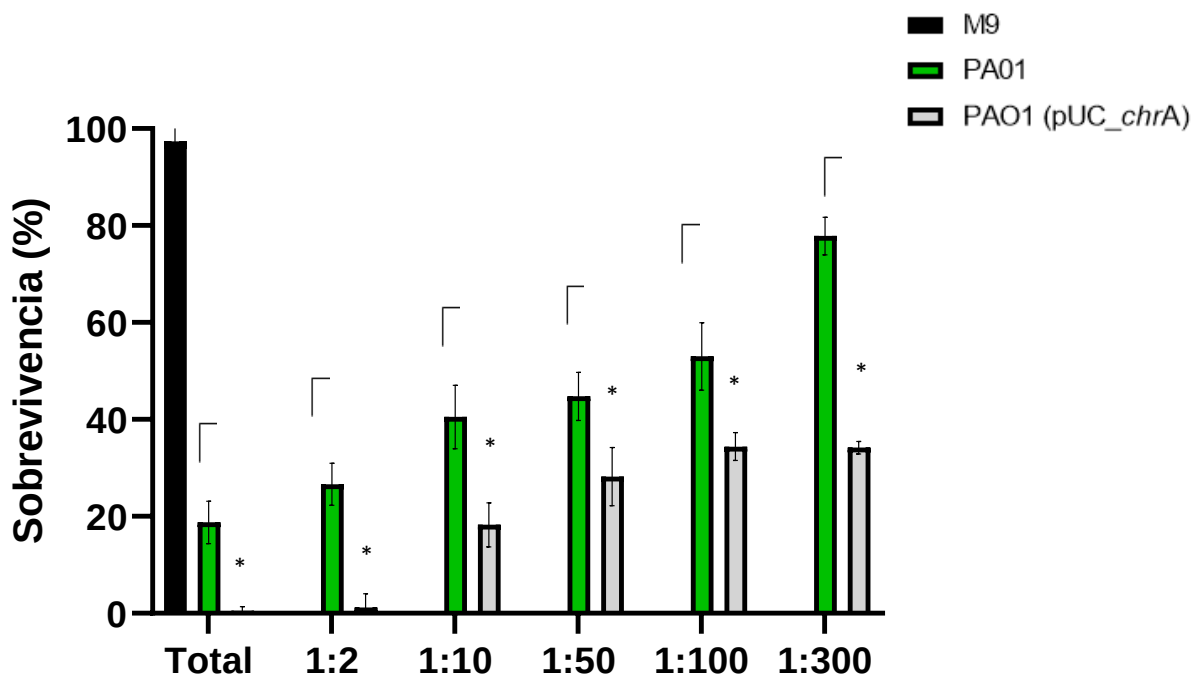


Figura 13. Toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con el gen *chrA*. Medio M9 usado como control negativo, se emplearon los sobrenadantes obtenidos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_ *chrA*) a diferentes concentraciones. Se representa la sobrevivencia de los nematodos obtenida a las 42 h posincubación. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett * $p < 0.05$.

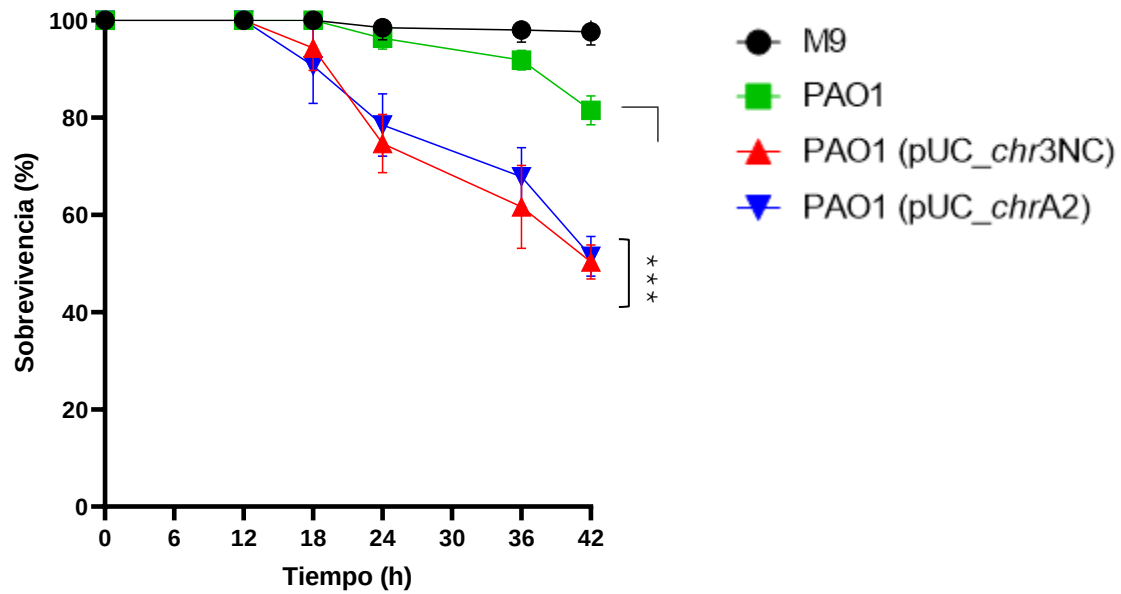


Figura 14. Virulencia conferida por las transformantes de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes de resistencia a cromato. Ensayos realizados con los cultivos crecidos en medio M9. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$.

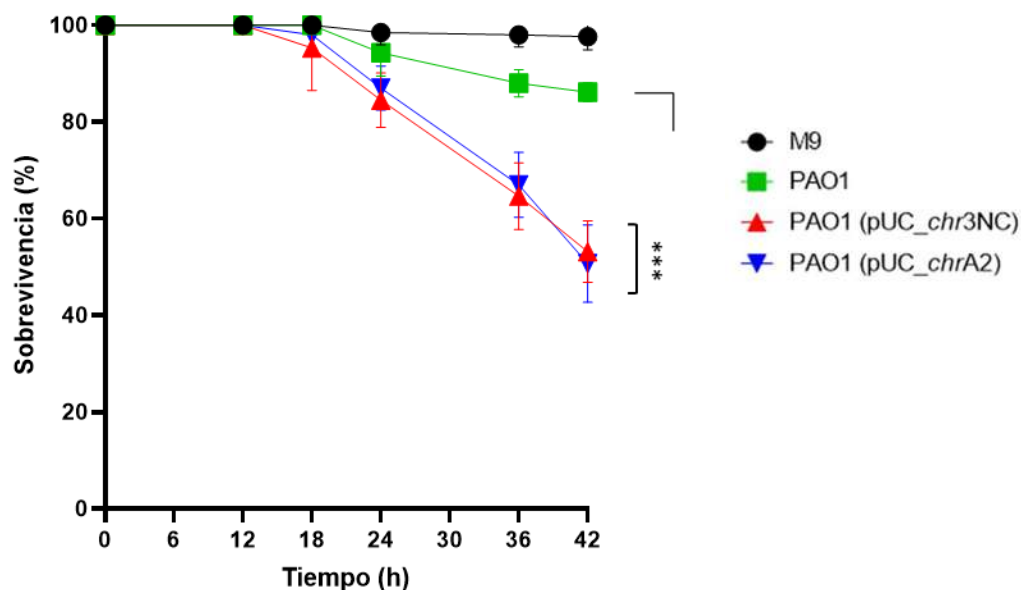


Figura 15. Toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes de resistencia a cromato. Ensayos realizados con los sobrenadantes obtenidos de las bacterias crecidas en medio M9. Medio M9 usado como control negativo, sobrenadantes diluidos 1:300. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$.

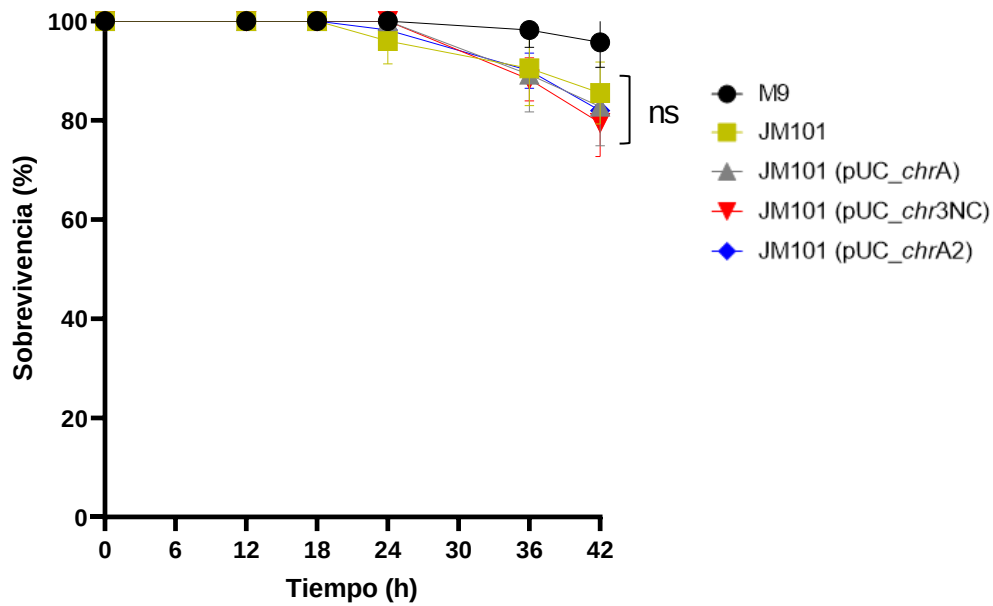


Figura 16. Virulencia conferida por las bacterias de *E. coli* JM101 con los genes de resistencia a cromato. Ensayos realizados con las bacterias crecidas en medio M9. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett ns no significativo.

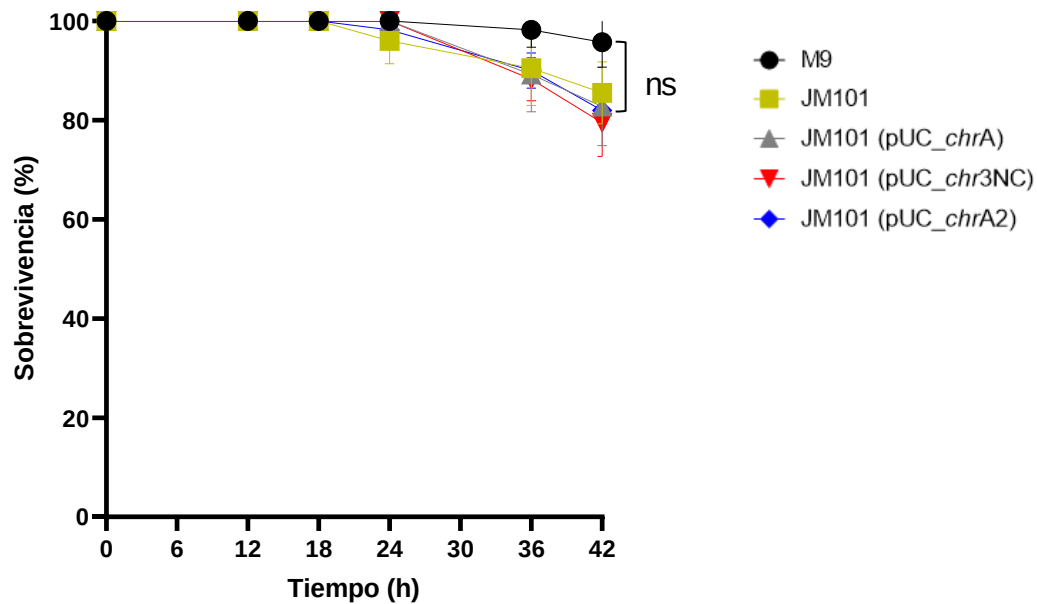


Figura 17. Toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las cepas de *E. coli* JM101 con los genes de resistencia a cromato. Ensayos realizados con los sobrenadantes de las bacterias crecidas en medio M9. Medio M9 usado como control negativo. Sobrenadante diluido 1:300. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett ns no significativo.

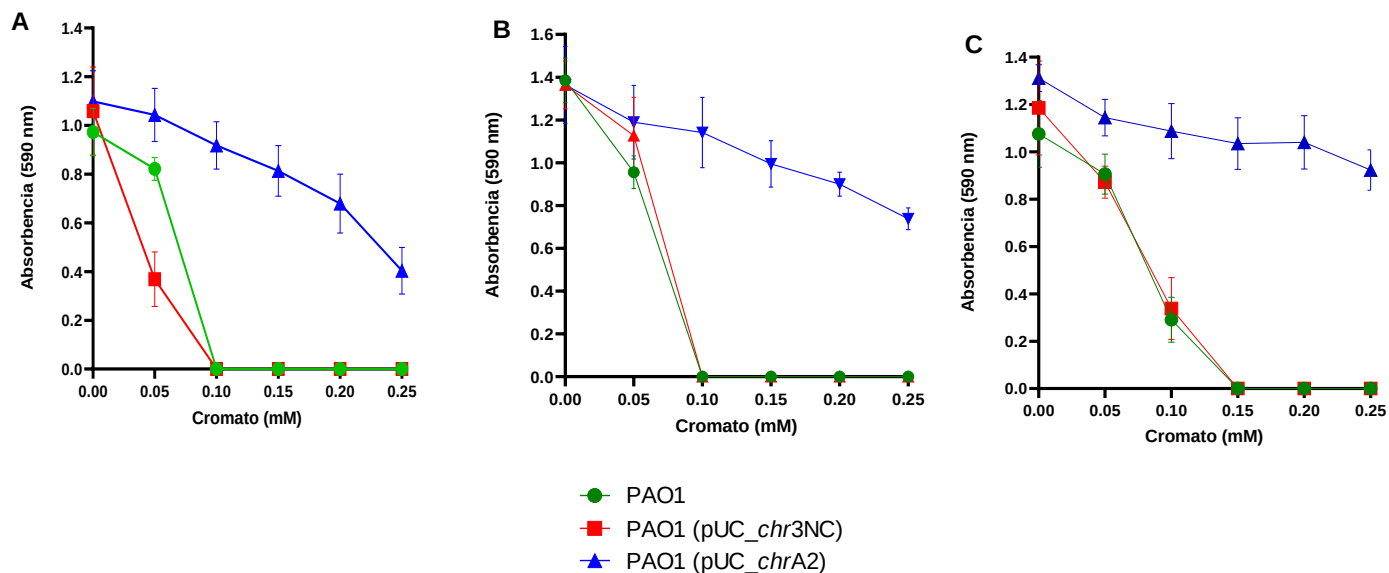


Figura 18. Curvas de susceptibilidad a K_2CrO_4 con modificaciones en la concentración de sulfato en medio M9. Cultivos bacterianos fueron crecidos en medio M9 con las siguientes modificaciones: **A.** baja concentración de $MgSO_4$ (0.2 mM), **B.** concentración estándar de $MgSO_4$ (2 mM) y **C.** alta concentración de $MgSO_4$ (6 mM). Los cultivos se crecieron durante 22 h, a 37°C con agitación constante. Se midió la absorbencia a D.O. 590nm. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar.

11.1.8 Ensayos de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes con disminución en la concentración de sulfato en el medio

Dado que el sulfato modifica la resistencia a cromato, se evaluó el efecto de este ion en la virulencia y en la toxicidad de los sobrenadantes de las cepas que poseen a los genes *chr*. Los resultados mostraron que el porcentaje de sobrevivencia de los nematodos incubados con transformantes de *P. aeruginosa* con los genes *chr* crecidas en 0.2 mM de sulfato fue mayor (80-85%) en comparación con las mismas bacterias crecidas con 2 mM de sulfato (~55%).

Los sobrenadantes de las cepas *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr* crecidas con 0.2 mM de sulfato mostraron mayor sobrevivencia de los nematodos (80-85%) en comparación con los sobrenadantes de los cultivos crecidos en 2 mM de sulfato (50%) (Fig. 19 C y D), sugiriendo que la toxicidad de los sobrenadantes disminuye por la disminución en la concentración de sulfato en el medio de cultivo.

11.1.9 Ensayos de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes con aumento en la concentración de sulfato en el medio

Adicionalmente, se determinó el efecto del aumento de la concentración de sulfato (6 mM) en la virulencia y la toxicidad de los sobrenadantes conferida por las bacterias de *P. aeruginosa* con los genes *chr3NC* y *chrA2*.

Los resultados mostraron una ligera disminución en la sobrevivencia de los nematodos (~54%), en comparación con la sobrevivencia de los cultivos crecidos en 2 mM de sulfato (~50%) (Fig. 20 A y B)

De igual manera se observó un ligero incremento (40-45%) en la toxicidad de los sobrenadantes de los cultivos crecidos en 6 mM de sulfato (Fig. 20 D). Estos datos

confirman que la concentración de sulfato modifica la virulencia conferida por las proteínas Chr.

11.1.10 Ensayos de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes con aumento en la concentración de fosfato en el medio

Dado que el fosfato posee una estructura tetraédrica similar al sulfato, se determinó el efecto de este ion en la virulencia y en la toxicidad de las bacterias con los genes *chr*. La adición de 2mM de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) al medio de cultivos M9 suplementado con una concentración estándar de fosfato (0.11 M) generó la disminución de la sobrevivencia de los nematodos a 35-40% en comparación con 55% generado con los cultivos crecidos en el medio M9 sin adición de fosfato (Fig. 21 A y B).

De igual manera, se observó un ligero aumento en la toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de los cultivos crecidos con un incremento de fosfato en el medio cultivo (Fig. 21 C y D).

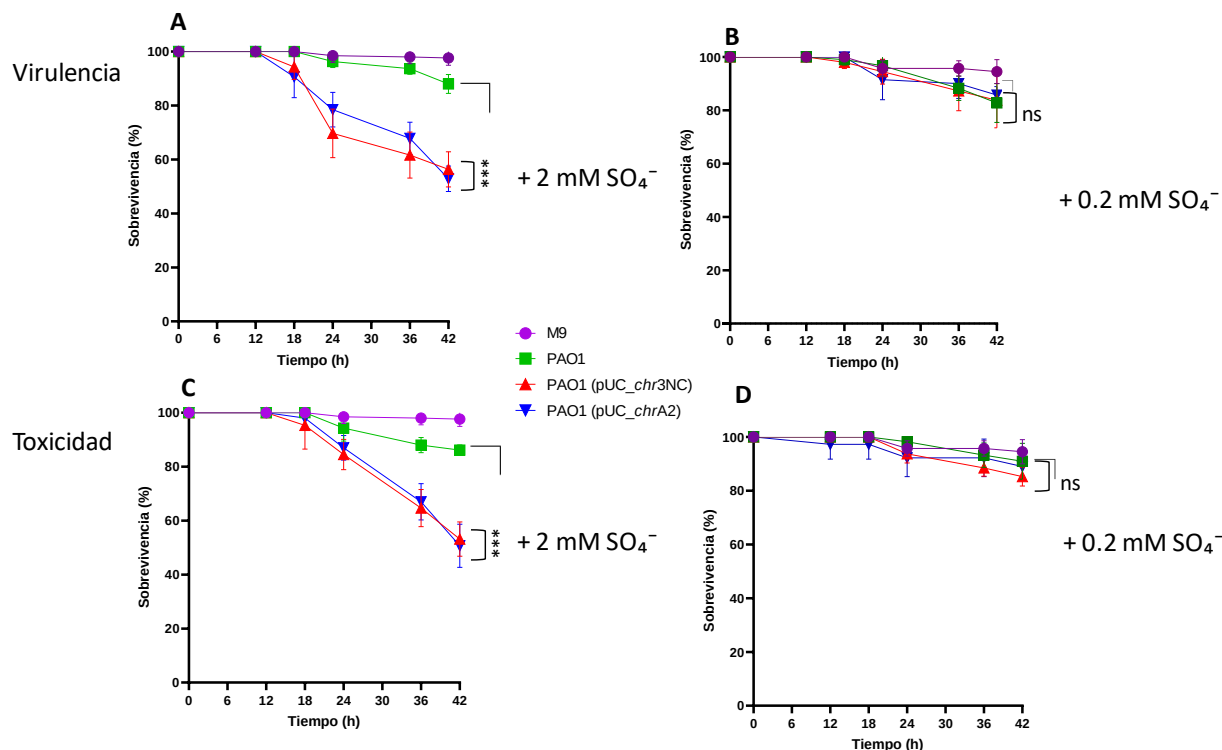


Figura 19. Virulencia y toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr* en medio con una disminución de la concentración de sulfato. Ensayos realizados con las bacterias y/o sobrenadantes obtenidos de medio M9 con 0.2 mM o 2.0 mM. Ensayos de virulencia (**A y B**): **A.** empleando cultivos crecidos con 2 mM de sulfato **B.** Empleando cultivos crecidos con 0.2 mM de sulfato. Ensayos de toxicidad de los sobrenadantes diluidos 1:300 (**C y D**): **C.** empleando el sobrenadante de los cultivos crecidos con 2 mM de sulfato **D.** empleando el sobrenadante de los cultivos crecidos con 0.2 mM de sulfato. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo, N=3 (por duplicado). Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett ***p< 0.001 y ns no significativo.

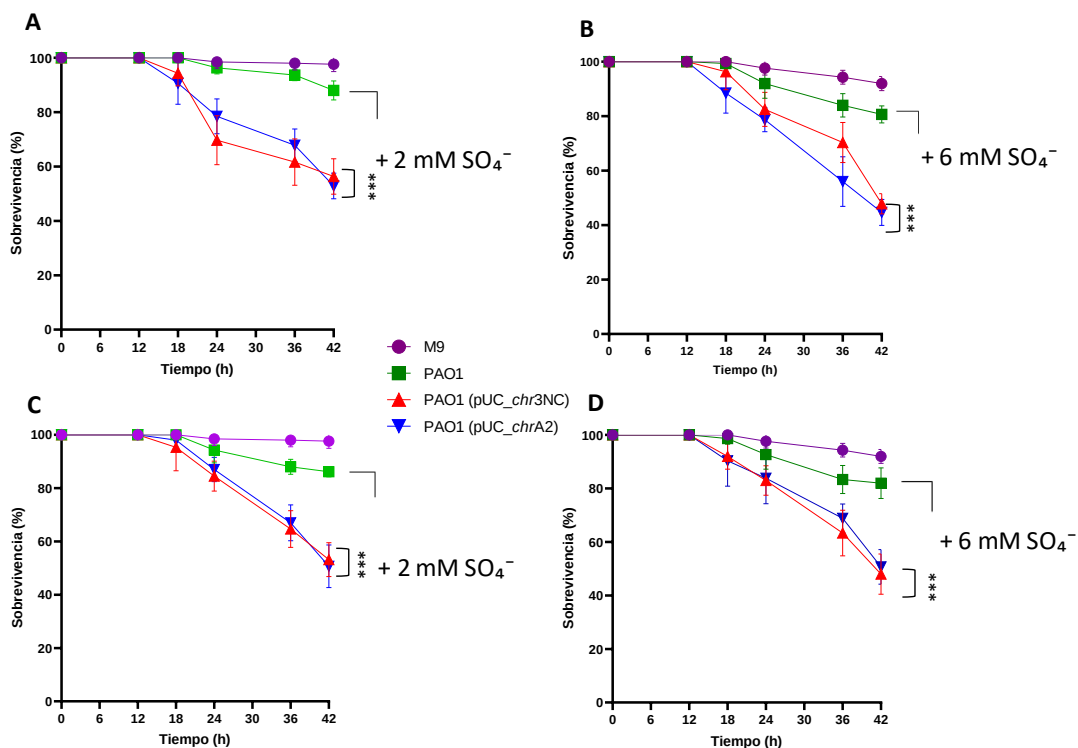


Figura 20. Efecto del sulfato en la virulencia y toxicidad de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr*. Ensayos realizados con las bacterias y/o sobrenadantes obtenidos de medio M9 con 2 y 6 mM de sulfato. Ensayos de virulencia (**A y B**): **A.** empleando cultivos crecidos con 2 mM de sulfato **B.** empleando cultivos crecidos con 6 mM de sulfato. Ensayos de toxicidad de los sobrenadantes diluidos 1:300 (**C y D**): **C.** empleando el sobrenadante de los cultivos crecidos con 2 mM de sulfato. **D.** empleando el sobrenadante de los cultivos crecidos con 6 mM de sulfato. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$.

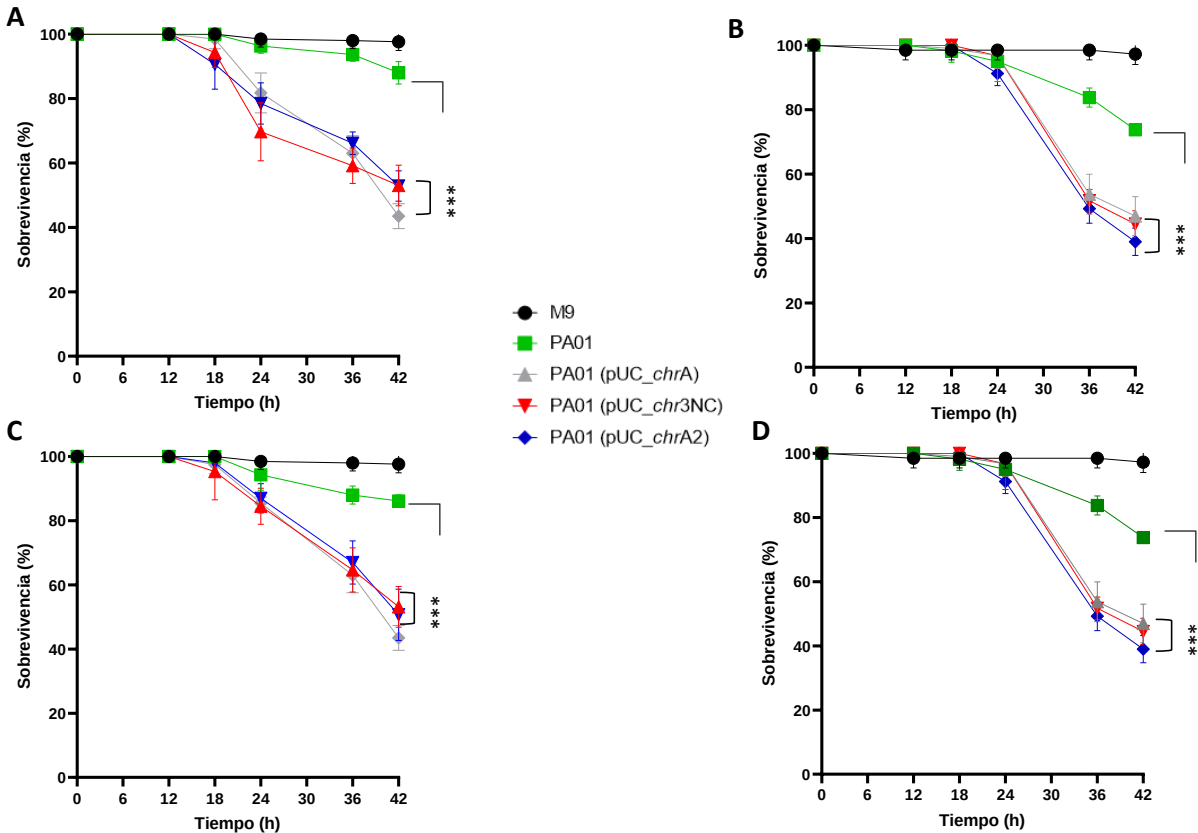


Figura 21. Efecto del fosfato en la virulencia y toxicidad de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr*. Las bacterias se crecieron en medio M9 con concentraciones variables de fosfato (KH_2PO_4). **A.** Virulencia de las bacterias crecidas con la concentración estándar de fosfato (112 mM). **B.** Virulencia de las bacterias crecidas con el incremento de 2 mM a la concentración de fosfato. **C.** Toxicidad de los sobrenadantes de los cultivos crecidos con la concentración estándar de fosfato (112 mM). **D.** Toxicidad de los sobrenadantes de los cultivos crecidos con la adición de 2 mM de fosfato. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$.

11.1.11 Ensayos de virulencia y toxicidad de los sobrenadantes de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta lasI/rhI$ con los genes de resistencia a cromato

Para evaluar la participación del sistema de QS en la virulencia conferida por los genes *chr* en *P. aeruginosa* se realizó la transformación de la cepa de *P. aeruginosa* $\Delta lasI/rhI$ con los plásmidos pUC_ *chrA*, pUC_ *chr3NC* y pUC_ *chrA2*. La cepa de *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta lasI/rhI$ es una mutante doble los genes *lasI* y *rhI* de los sistemas Las y Rhl respectivamente, del QS.

Primeramente, se evaluó el nivel de resistencia a cromato de las transformantes obtenidas. Se observó que las cepas de *P. aeruginosa* $\Delta lasI/rhI$ (pUC_ *chrA*) y *P. aeruginosa* (pUC_ *chrA2*) conservan el fenotipo de resistencia a cromato, ambas cepas mostraron crecimiento en presencia de cromato en ambos medios de cultivo en comparación con la cepa *P. aeruginosa* $\Delta lasI/rhI$ (Fig. 22 A y B). Por otro lado, la cepa de *P. aeruginosa* $\Delta lasI/rhI$ (pUC_ *chr3NC*) mostró ser sensible a cromato en CN (Fig. 22 A). Sin embargo, mostró conferir resistencia a cromato en medio M9 (Fig. 22 B). Estos datos sugieren que la resistencia a cromato conferida por los genes *chrA* y *chrA2* no es regulada por el sistema de QS, pero que dicho sistema regula la resistencia a cromato conferida por los genes *chr3NC* en un medio mínimo.

Posteriormente se determinó la virulencia conferida por los genes *chr* en el fondo mutante del QS. Los resultados mostraron como se esperaba que la cepa de *P. aeruginosa* $\Delta lasI/rhI$ no es virulenta, sin embargo, se observó que las transformantes con los genes *chr* disminuyeron la sobrevivencia de los nematodos siendo más virulentas (Fig. 23 A). De manera similar se observó que la presencia de los genes *chr* en la cepa de *P. aeruginosa* $\Delta lasI/rhI$ generaron sobrenadantes tóxicos para el nematodo al

disminuir su sobrevivencia (Fig. 23 B). Por lo cual se concluyó que los sistemas LasI y RhlI del QS no regulan la virulencia o toxicidad conferida por los genes *chr*.

11.1.12 Participación del potencial de membrana en el mecanismo de virulencia y toxicidad de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr*.

La proteína ChrA es una bomba de expulsión de cromato, dependiente del potencial de membrana, potencial que es inhibido por la presencia de cianuro de potasio (KCN). Para evaluar la participación del potencial de membrana en el fenotipo de virulencia y toxicidad conferido por las proteínas *chr* se realizaron ensayos incubando a los cultivos en presencia de una concentración subinhibitoria de KCN (100 μ M).

Primeramente, se analizó la resistencia a cromato conferida por los genes *chr* en cultivos suplementados con la concentración subinhibitoria de KCN. Los resultados mostraron, como se esperaba, que las transformantes de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr* fueron sensibles a cromato (Fig. 24), confirmando que la función de expulsión del cromato de las proteínas *chr* es dependiente del potencial de membrana.

Por lo que, se determinó la participación del potencial de membrana en la virulencia y toxicidad del sobrenadante de las cepas con los genes *chr*.

Los resultados mostraron que el crecimiento de las bacterias con los genes *chr* no fueran virulentas, los nematodos mostraron ~80% de sobrevivencia (Fig. 25 A). Estos datos sugieren que la virulencia conferida por las proteínas *chr* requiere de la participación del potencial de membrana.

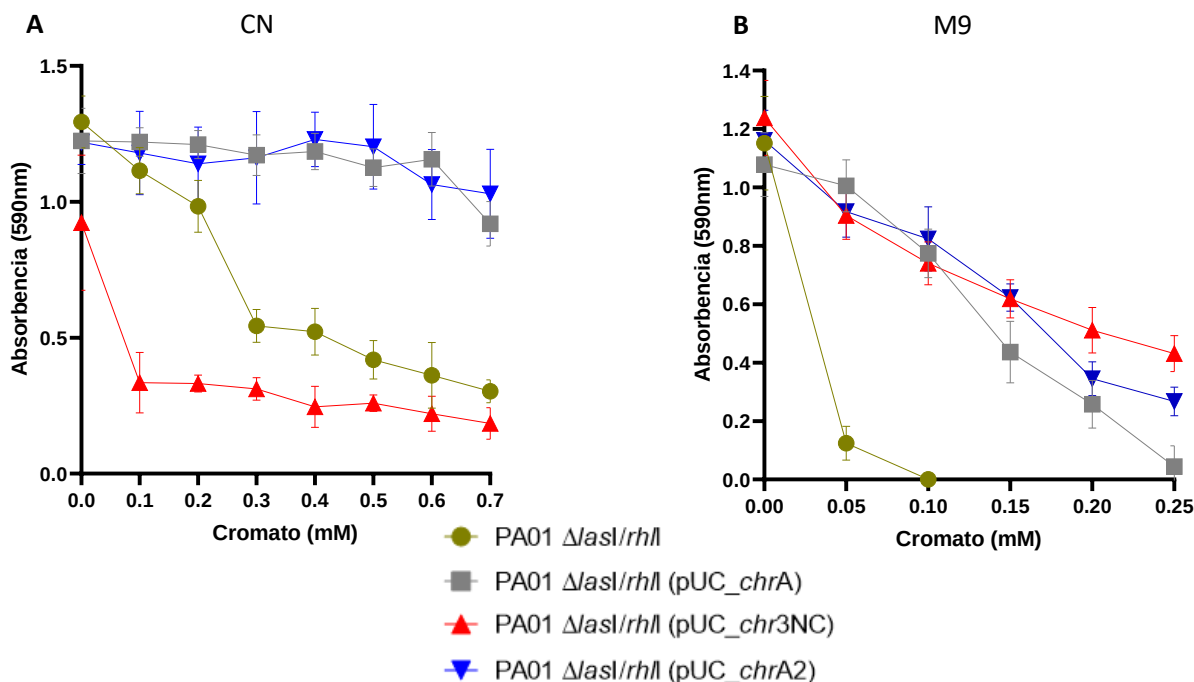


Figura 22. Resistencia a cromato de las cepas *P. aeruginosa* PA01 $\Delta lasI/rhlI$ con los genes *chr*. Las curvas se obtuvieron de cultivos crecidos **A.** en medio CN durante 18 h y **B.** en medio M9 durante 22 h, ambas curvas se crecieron a 37°C con agitación constante con concentraciones crecientes de K₂CrO₄. Y se midió la absorbencia a D.O. 590nm. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar.

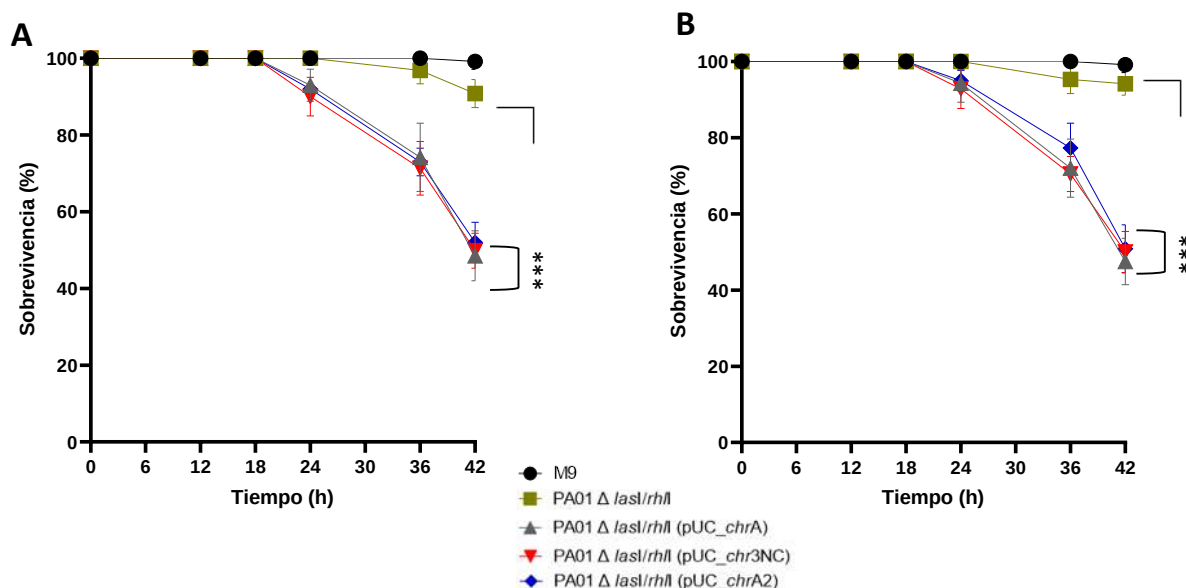


Figura 23. Virulencia y toxicidad de los sobrenadantes obtenidos de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta las/rhl$ con los genes *chr*. Los ensayos se realizaron empleando las bacterias o el sobrenadante de los cultivos crecidos en M9. **A.** Virulencia conferida por las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta las/rhl$ con los genes *chr*. **B.** Ensayos de toxicidad de los sobrenadantes diluidos 1:300 de las cepas de $\Delta las/rhl$ con los genes *chr*. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunnett *** $p < 0.001$.

Además, los resultados mostraron la disminución de la toxicidad de los sobrenadantes de los cultivos crecidos en presencia de KCN de las cepas con los genes *chr*, la sobrevivencia de los nematodos fue de ~80% (Fig. 25 B).

Adicionalmente se emplearon concentraciones variables (10, 50 y 100 μ M) de KCN para analizar si el efecto de disminución de virulencia de las cepas con los genes *chr* depende de la concentración de KCN empleada. Los resultados mostraron que 10 μ M no modifica la virulencia de los cultivos (Fig. 26 B) la sobrevivencia de los nematodos fue similar (~35%) al de los cultivos sin adición de KCN (Fig. 26 A). Sin embargo, se observó que el aumento de la concentración de KCN disminuyó la virulencia de los cultivos de manera dosis dependiente (Fig. 26 C).

Por otro lado, se evaluó el efecto de la concentración de KCN (10, 50 y 100 μ M) en la toxicidad de los sobrenadantes. Los resultados mostraron efecto similar a la virulencia de los cultivos (Fig. 26), el aumento de la concentración de KCN en el medio de cultivo disminuyó la toxicidad de los sobrenadantes de *P. aeruginosa* con los genes *chr* (Fig. 27). Esto sugiere que el efecto en la virulencia y toxicidad dosis dependiente de la concentración de KCN puede ser a consecuencia del grado de inhibición del potencial de membrana, indicando que dicho potencial es necesario para el mecanismo de virulencia conferido por las proteínas Chr.

11.1.13 Efecto de la neutralización de especies reactivas de oxígeno (ERO) en las bacterias de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr*

Para evaluar la relación del estrés oxidativo en la virulencia y la toxicidad del sobrenadante de las bacterias con los genes *chr*, los cultivos fueron crecidos con una concentración subinhibitoria de N-acetilcisteína NAC, una molécula antioxidante.

Se analizó el efecto de 7.5 mM de NAC (una concentración determinada como subinhibitoria) en la resistencia a cromato conferida por las proteínas Chr observando que la susceptibilidad a cromato de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chr* disminuye en presencia de NAC, mostrando un nivel de susceptibilidad a cromato similar a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 28). Además, se observó que la virulencia y la toxicidad de los sobrenadantes de las bacterias con los genes *chr* crecidas en presencia de NAC disminuyó con respecto a los cultivos sin NAC (Fig. 29 A y B). La sobrevivencia de los nematodos incubados con los cultivos de *P. aeruginosa* con los genes *chr* fue de ~80%, similar a la sobrevivencia de los nematodos incubados con *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 29). Por otro lado, también aumentó la sobrevivencia de los nematodos tratados con los sobrenadantes de los cultivos crecidos en presencia de NAC (Fig. 29 B).

Estos datos sugieren que las ERO participan en la virulencia y toxicidad conferida por las proteínas Chr.

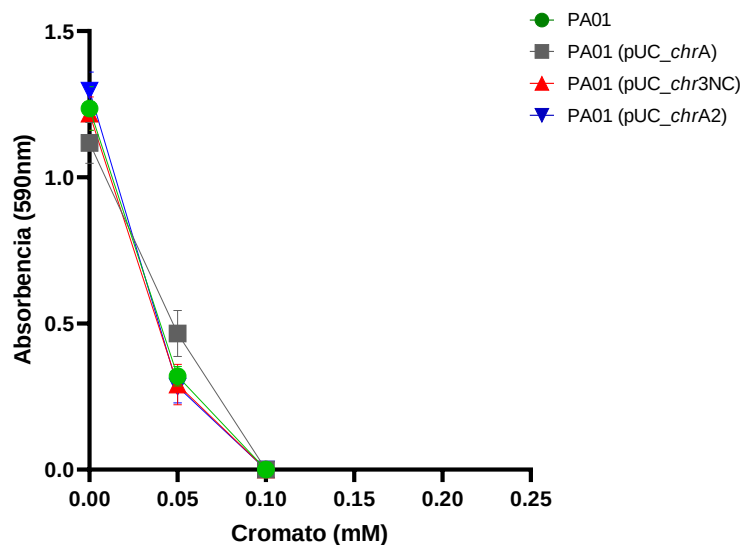


Figura 24. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr* en presencia de KCN. La curva se obtuvo de cultivos crecidos en medio M9 durante 22 h con una concentración de 100 μ M de KCN (subinhibitoria), a 37°C con agitación constante, a concentraciones crecientes de K_2CrO_4 . Se midió la absorbencia a D.O. 590nm. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar.

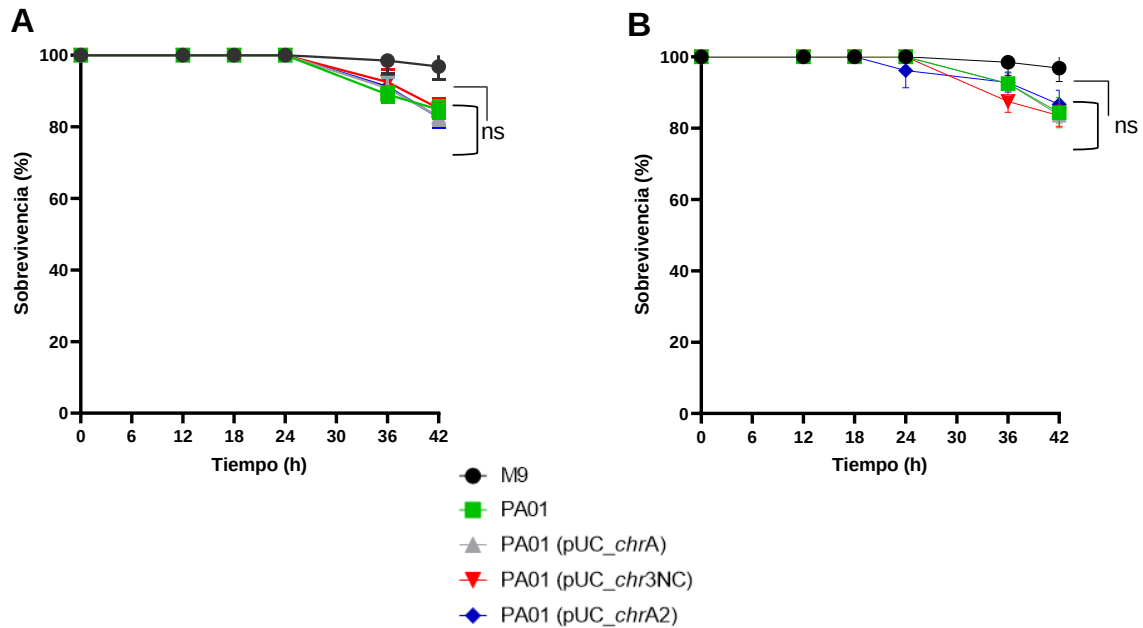


Figura 25. Efecto del cianuro de potasio en la virulencia y toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr*. Los cultivos fueron crecidos en medio M9 crecidas con 100 μ M de KCN, los sobrenadantes se obtuvieron filtrando los cultivos en filtros millipore **A.** Virulencia de los cultivos. **B.** Toxicidad de los sobrenadantes diluidos 1:300. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett, ns no significativo.

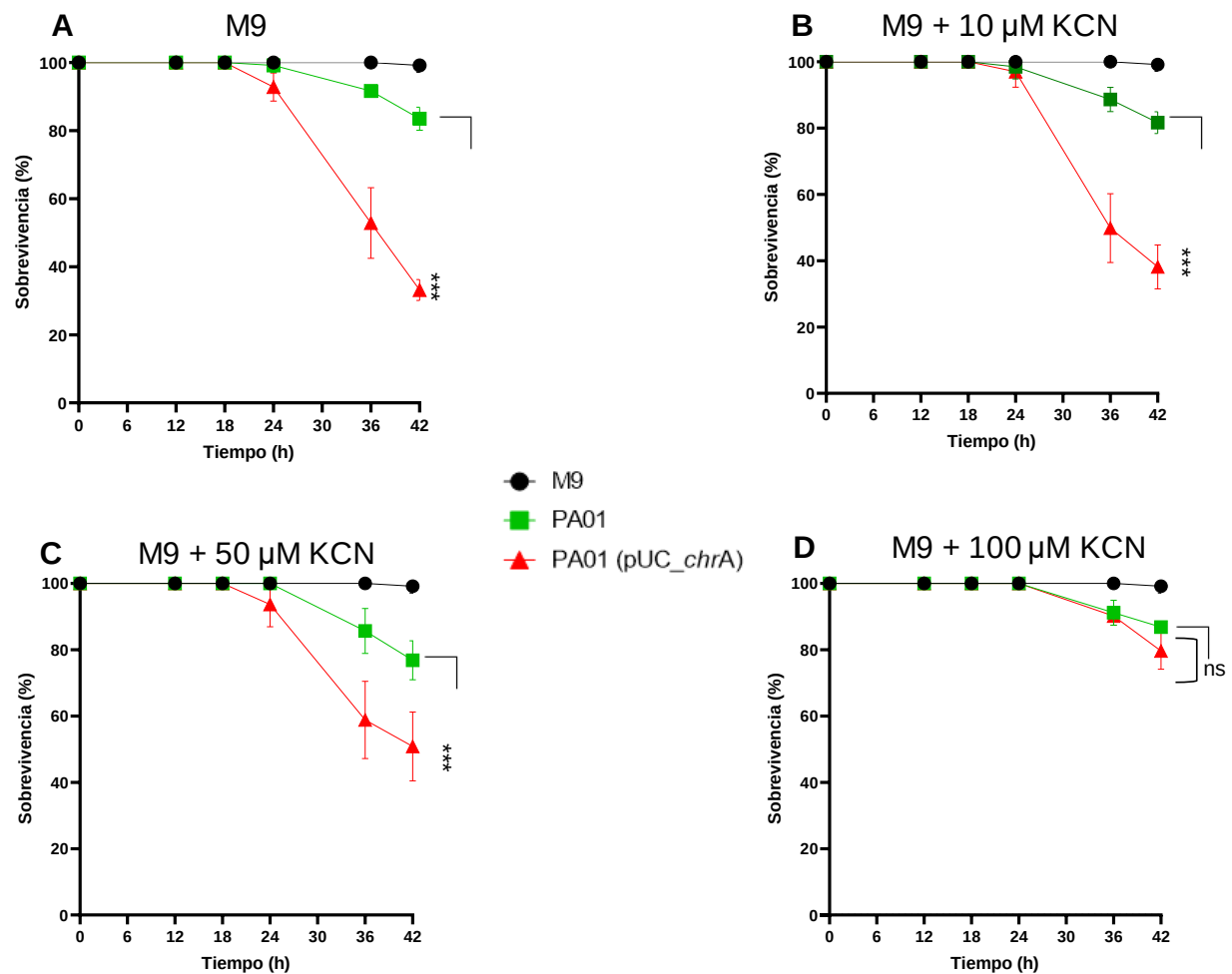


Figura 26. Efecto de la concentración de KCN en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_chrA). Las bacterias fueron crecidas en medio M9 en ausencia o con la adición de diferentes concentraciones de KCN. **A.** Virulencia de las bacterias sin la adición de KCN al medio de cultivo. **B.** con la adición de 10 μ M de KCN. **C.** con la adición de 50 μ M de KCN. y **D.** con la adición de 100 μ M de KCN. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$ y ns no significativo.

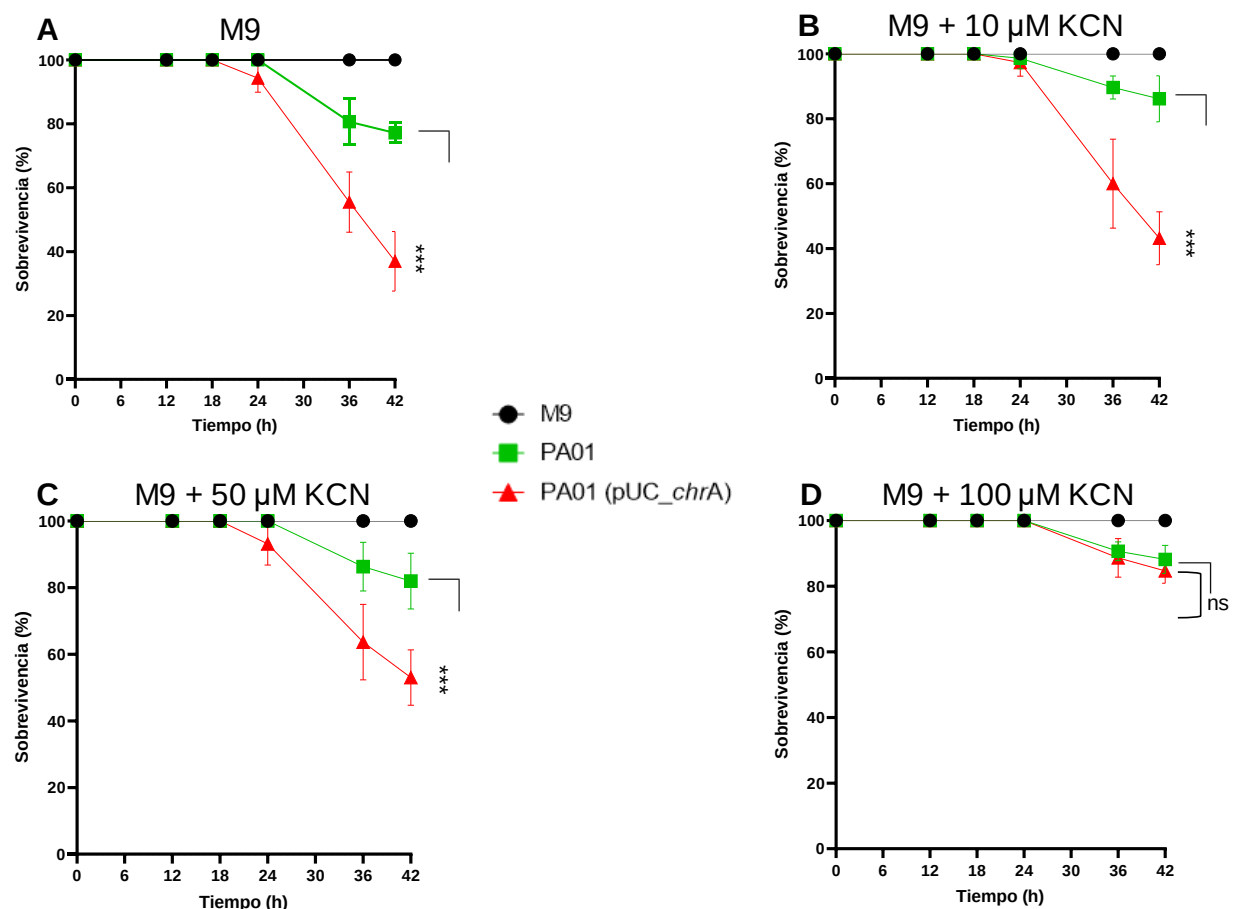


Figura 27. Efecto de la concentración de KCN en la toxicidad de los sobrenadantes de *P. aeruginosa* con los genes *chr*. Ensayos realizados con los sobrenadantes con los cultivos de *P. aeruginosa* obtenidos de medio M9 con ausencia o presencia de diferentes concentraciones de KCN. Sobrenadantes de cultivos crecidos **A.** sin la adición. **B.** con 10 μM. **C.** con 50 μM y **D.** con 100 μM de KCN, respectivamente. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** p<0.001 y ns no significativo.

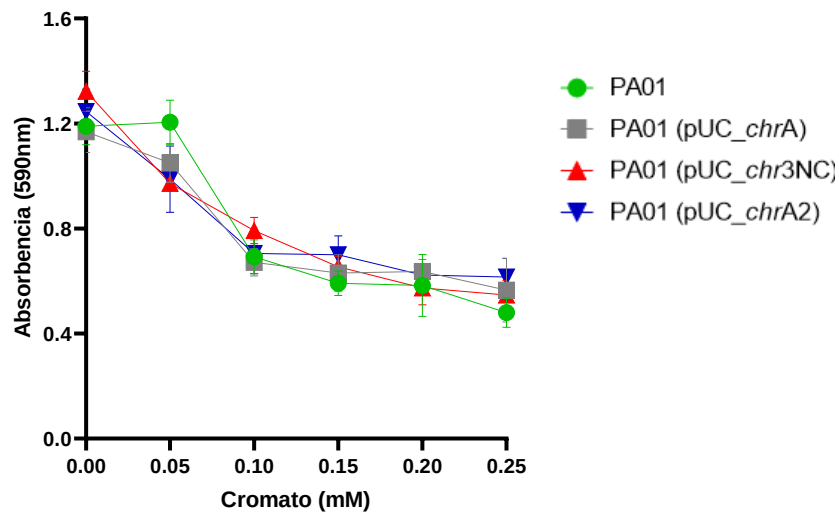


Figura 28. Susceptibilidad a cromato de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chr* en presencia de NAC. Los cultivos se crecieron en medio M9 a 37°C con agitación constante durante 22 h, suplementados con 7.5 mM de NAC y a concentraciones crecientes de K₂CrO₄. Se midió la absorbencia a una D.O. 590nm. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar.

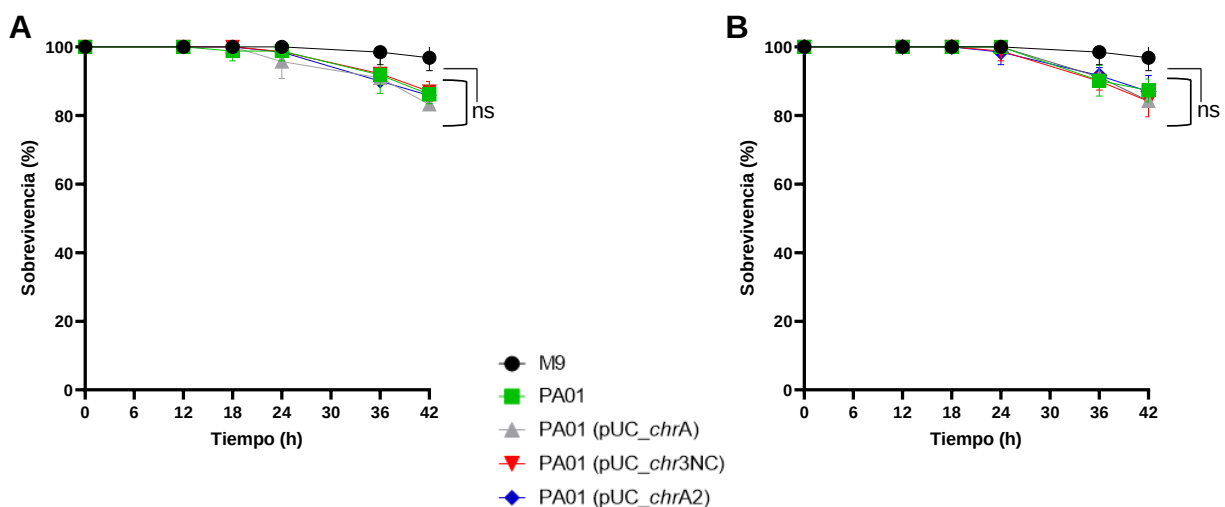


Figura 29. Efecto de la NAC en la virulencia y toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa*. Los cultivos se crecieron a 37°C con agitación constante durante 22 h en medio M9 crecidas con 7.5 mM de NAC. **A.** Ensayos de virulencia. **B.** Ensayos de toxicidad de los sobrenadantes diluidos 1:300. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett, ns no significativo.

11.1.14 Inducción por cromato del nivel de toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chrA*, *chr3NC* y *chrA2*

La expresión del gen *chrA* del plásmido pUM505 se induce en presencia de una concentración subinhibitoria de cromato, por lo que se realizaron ensayos de toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chr* crecidos con una concentración subinhibitoria de cromato (0.5 μ M).

Los resultados mostraron que los sobrenadantes de los cultivos crecidos en presencia de la concentración subinhibitoria de cromato fueron más tóxicos, generando ~30 a 20% de sobrevivencia de los nematodos (Fig. 30 A y B) en comparación al ~50% de sobrevivencia observada cuando los cultivos no fueron incubados con cromato (Fig. 15). Lo cual sugiere que la presencia de una concentración subinhibitoria de cromato induce la expresión de los genes *chr* aumentando la toxicidad de los sobrenadantes.

11.1.15 Cuantificación de la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de las cepas con los genes de resistencia a cromato

Ya que en experimentos anteriores se observó que las ERO tienen un papel en el aumento de virulencia de *P. aeruginosa* con los genes *chr*, se determinó la producción de peróxido de hidrógeno (una especie reactiva de oxígeno común en las bacterias), en las cepas *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr*.

Los resultados mostraron que las bacterias con los genes *chr* produjeron cuatro veces mayor producción de H₂O₂ que la cepa control (Tabla 6). Sin embargo, no se observa diferencia en la concentración entre los diferentes tratamientos de H₂O₂.

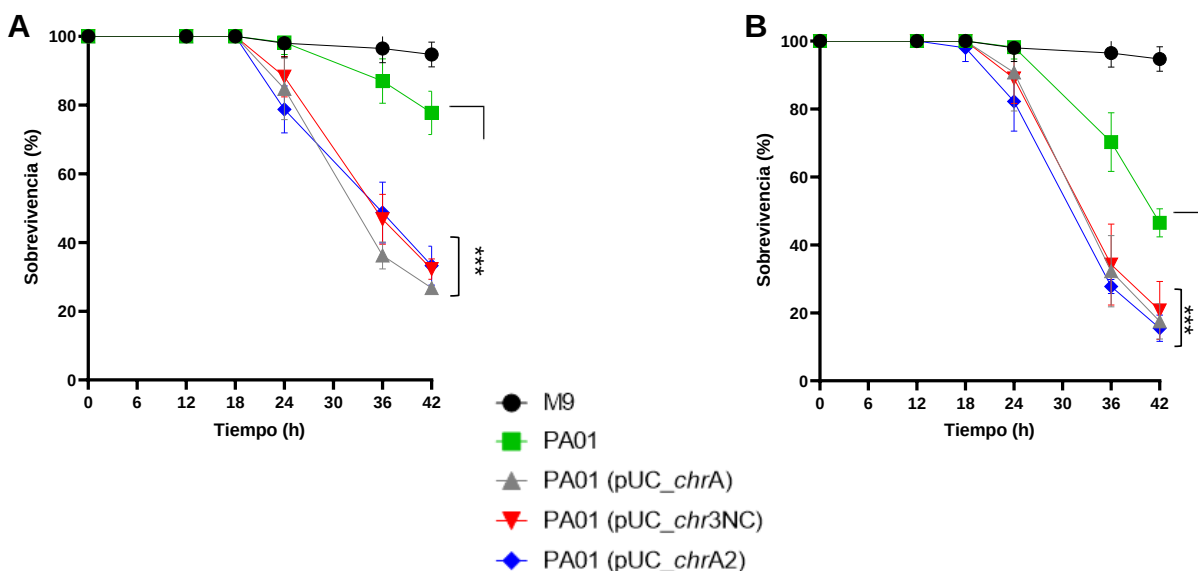


Figura 30. Toxicidad de los sobrenadantes y de los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 crecidos en presencia de una concentración subinhibitoria de cromato. Los cultivos fueron crecidos a 37°C con agitación constante durante 22 h en medio M9 en presencia de 0.5 μ M de K_2CrO_4 . **A.** Toxicidad de los sobrenadantes diluidos 1:300. **B.** Toxicidad de los sobrenadantes totales. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$.

Tabla 6. Cuantificación de producción de peróxido de hidrogeno de las cepas de *P. aeruginosa*.

Cepa	M9 (2 mM SO ₄ ²⁻)	M9 (2 mM SO ₄ ²⁻) + Cr	M9 + (0.2 mM SO ₄ ²⁻)
M9	0.0	0.0	0.0
PA01	0.01 ± 0.005	0.02 ± 0.008	0.013 ± 0.003
PA01 (pUC_ <i>chrA</i>)	0.0462 ± 0.0052 *	0.04 ± 0.01 *	0.043 ± 0.004 *
PA01 (pUC_ <i>chr3NC</i>)	0.043 ± 0.004 *	0.04 ± 0.01 *	0.051 ± 0.009 *
PA01 (pUC_ <i>chrA2</i>)	0.055 ± 0.01 *	0.046 ± 0.009 *	0.046 ± 0.004 *

Los cultivos fueron crecidos en medio M9, se usó sulfato de magnesio (MgSO₄) como fuente de SO₄²⁻ a las concentraciones indicadas y cuando se indica se usó una concentración subinhibitoria (0.5 µM) de K₂CrO₄. Unidades de H₂O₂ en mg/mL. N=3 (por duplicado). Se muestra el promedio de tres experimentos independientes y la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett * p<0.05.

11.1.16 Consumo de oxígeno de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chr* en presencia de diferentes tratamientos

Para determinar el nivel del consumo de oxígeno de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr* durante su crecimiento en diferentes condiciones, se realizó una cuantificación de consumo de su oxígeno.

Los resultados mostraron que las cepas que poseen a los genes *chr* tienen un aumento en la tasa de consumo de oxígeno (~300 nmol/m*seg) en comparación con *P. aeruginosa* PAO1 cuyo consumo fue de ~200 nmol/m*seg (Fig. 31). Además, se observó que la presencia de cromato en el medio de cultivo aumento el consumo de oxígeno solamente de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr*, el consumo de *P. aeruginosa* (pUC_ChxA) fue de ~400 nmol/m*seg, mientras que *P. aeruginosa* (pUC_Ch3NC) y *P. aeruginosa* (pUC_ChA2) mostraron un consumo de ~450 nmol/m*seg. Por otro lado, se observó que los cultivos con KCN, NAC, SO₄⁻ (0.2 mM) y DTT, no modificaron el consumo de oxígeno en ninguna de las cepas con respecto a los cultivos crecidos en medio M9.

11.1.17 Cuantificación de la expresión de los genes *chr3NC* y *chrA2*

Se determinaron los niveles de RNAm de los genes *chr3NC* y *chrA2* en las cepas de *P. aeruginosa* crecidas en diferentes condiciones mediante RT-qPCR y posteriormente los resultados fueron comparados mediante un análisis $\Delta\Delta CT$.

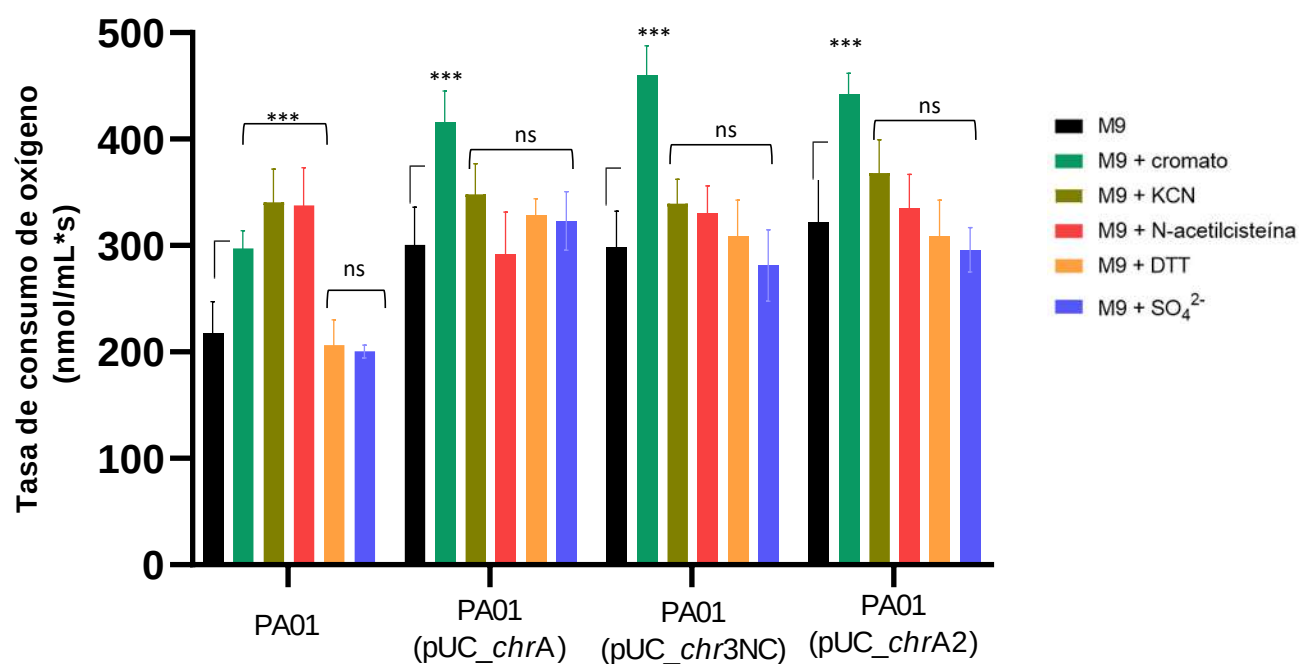


Figura 31. Cuantificación del consumo de oxígeno de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chrA*, *chr3NC* y *chrA2*. Ensayos realizados con las bacterias crecidas en M9 durante 22 h a 37°C, cuando se indica las bacterias se crecieron en presencia de: Cromato (0.5 μ M), KCN (100 μ M), NAC (7.5 mM), DTT (0.5 μ M) y SO₄²⁻ (0.2 mM). N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** p<0.001 y ns no significativo.

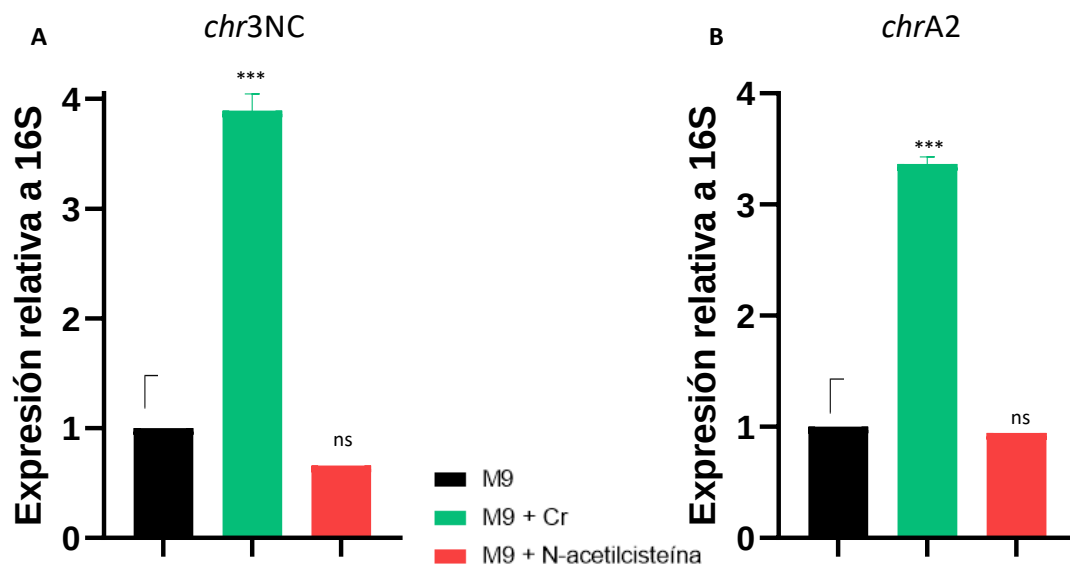


Figura 32. Cuantificación de los niveles de transcrito de los genes *chr* en las cepas de *P. aeruginosa*. Los cultivos fueron crecidos en medio M9 durante 22 h a 37°C con agitación constante y posteriormente se realizó el aislamiento del RNA total, cuando se indica los cultivos fueron crecidos en presencia de cromato (0.5 μ M) o NAC (7.5 mM). **A.** Nivel de RNAm del gen *chr3NC*. **B.** Nivel de RNAm del gen *chrA2*. Los resultados se analizaron por medio de análisis $\Delta\Delta$ CT, usando como gen de referencia el gen 16S de *P. aeruginosa*. N=2 (por duplicado), se muestra el promedio de dos experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$, ns no significativo.

Los resultados obtenidos, mostraron que tanto el par de genes *chr3NC* (Fig. 32 A), como el gen *chrA2* (Fig. 32 B), se expresan en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1. Además, que los niveles de transcrito en presencia de la concentración subinhibitoria de K₂CrO₄ aumenta hasta tres veces, respecto al nivel de transcrito de las cepas crecidas en el medio M9. Mientras que el tratamiento con N-acetilcisteína no muestra diferencias respecto al control, lo que confirma que el cromato induce la expresión de los genes *chr*.

11.2 Objetivo 3

11.2.1 Toxicidad del sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chr* tratados con proteasa y calor

Para conocer las características químicas y físicas de la molécula implicada en el aumento de la toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chr* se realizaron los ensayos de toxicidad con los sobrenadantes previamente tratados con proteasa o calor.

Los resultados mostraron que los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chrA*, *chr3NC* y *chrA2*, tratados con un coctel de proteasas (pronasa R 100 µg/mL) no fueron tóxicos, generando el mismo nivel de sobrevivencia de los nematodos (~90%) que el sobrenadante de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 33 A). Este resultado sugiere que las proteínas Chr secretan una molécula que es susceptible a degradación por proteasas.

De igual manera, los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr* sometidos a un tratamiento de calor (90° C durante 2 h) no fueron tóxicos para los nematodos. El nivel de sobrevivencia de los nematodos fue de ~90%, un valor similar

al del sobrenadante de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 33 B), sugiriendo que la molécula secretada por las proteínas Chr que participa en la virulencia es termosensible.

También, se realizó el análisis de la virulencia de los cultivos previamente tratados durante 5 min a 90°C, observando que los cultivos de las bacterias tratadas no fueron virulentos para los nematodos quienes mostraron ~90% de sobrevivencia (Fig. 34). Estos datos sugieren que la virulencia de las bacterias con los genes *chr* dependen de la estabilidad de membrana y que la molécula tóxica del sobrenadante además de ser termosensible, pudiera ser de naturaleza orgánica al requerir poco tiempo (5 min) para perder su actividad.

Adicionalmente, los sobrenadantes a diferente temperatura, desde 40 hasta 90°C (durante 2 h), para evaluar la susceptibilidad a la temperatura de la molécula probablemente secretada por las proteínas Chr. Los resultados mostraron que la toxicidad de todos los sobrenadantes de las cepas con los genes *chr* disminuyó a partir de su calentamiento a 60°C, generando ~80% de sobrevivencia de los nematodos, un valor parecido al de la cepa control (Fig. 35). Estos datos sugieren que la molécula tóxica probablemente secretada por las proteínas Chr pierde su estabilidad a partir de los 60°C.

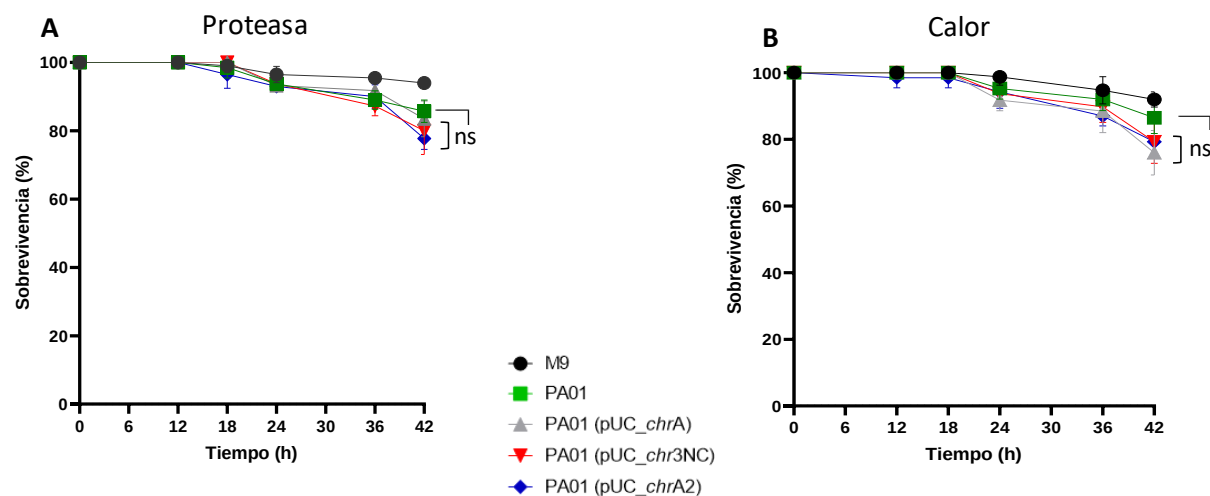


Figura 33. Efecto del tratamiento con proteasa o calor en la toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chr*. Los sobrenadantes fueron obtenidos de las cepas crecidas en medio M9. **A.** Toxicidad de los sobrenadantes tratados con Pronasa R [15 µg/mL]. **B.** Toxicidad de los sobrenadantes tratados con calor 90°C durante 2 h. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett ns no significativo.

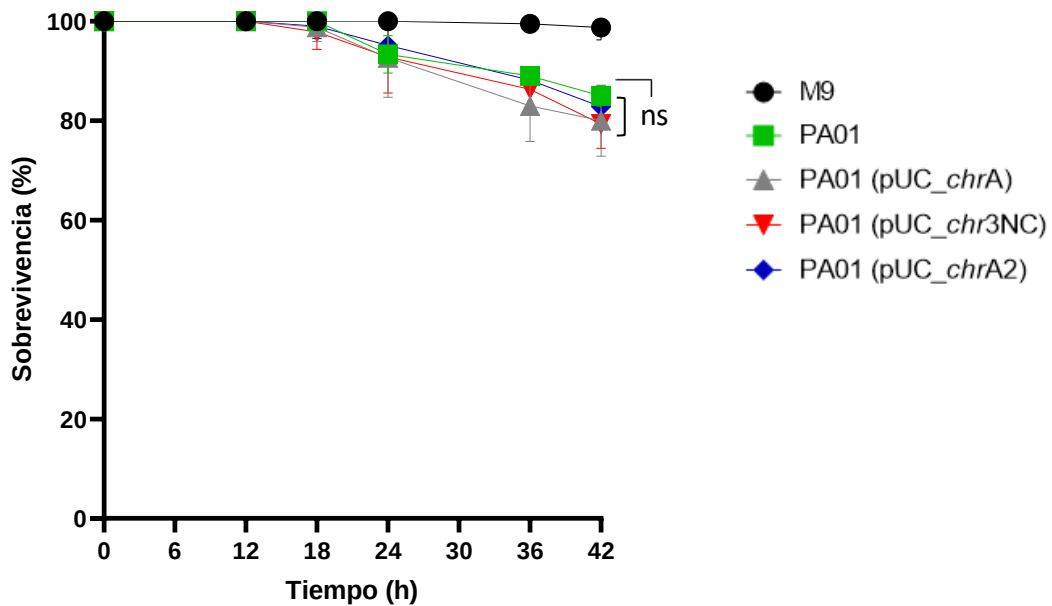


Figura 34. Virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* previamente tratada con calor.

Los cultivos se crecieron en medio M9 y cuando se indica los cultivos se incubaron 90°C por 5 min. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett ns no significativo.

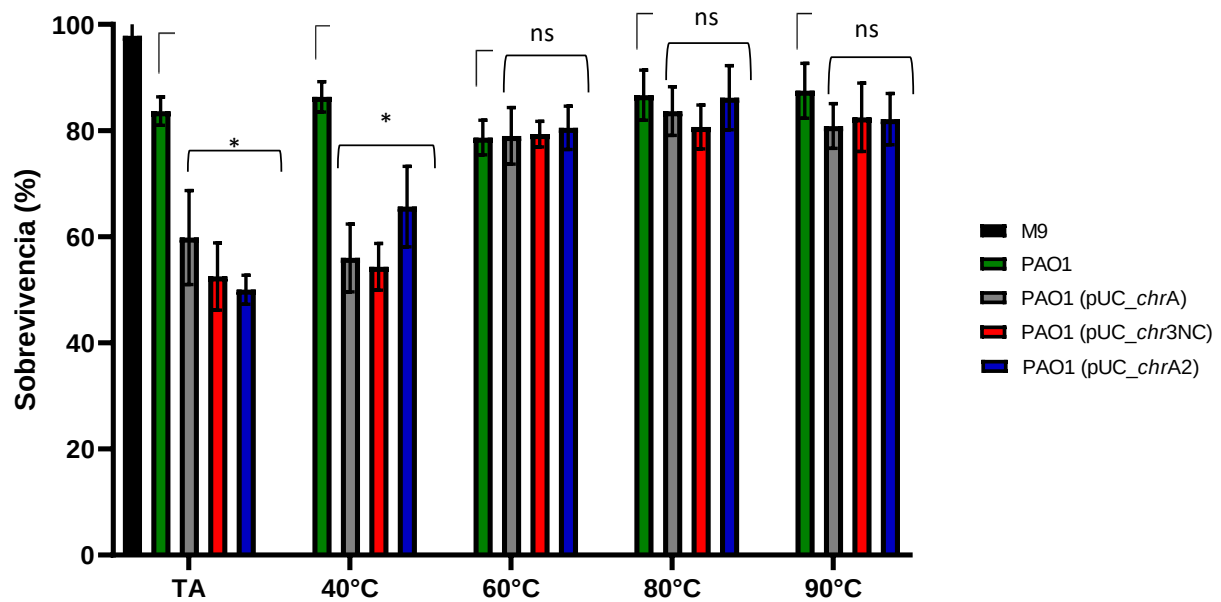


Figura 35. Toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr* tratados a diferentes temperaturas. Ensayos realizados con los sobrenadantes obtenidos de las cepas crecidas en medio M9 diluidos 1:300 y tratados previamente a: temperatura ambiente (TA), 40, 60, 80 y 90°C durante 2 h. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett * $p < 0.05$ y ns no significativo.

11.2.2 Cuantificación de factores de virulencia producidos por *P. aeruginosa* con los genes *chr*

Para evaluar el efecto de los genes *chr* en la producción de los factores de virulencia producidos por las cepas de *P. aeruginosa*, se realizó la cuantificación de diversos factores como biopelícula, el sideróforo fluorescente pioverdina, piocianina y proetasa alcalina.

Los resultados mostraron que la presencia de los genes *chr* no modificó el nivel de producción de estos factores, mostrando valores similares a la cepa control *P. aeruginosa* (Fig. 36).

Sin embargo, la presencia de los genes *chr* aumentó la producción de la enzima fosfatasa alcalina, que, aunque no es considerada un factor de virulencia actúa en condiciones de estrés y en deficiencia de nutrientes por medio de la captación del fosfato disponible en el medio, en las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chr* (Fig. 37). Estos datos podrían sugerir una relación entre la capacidad de captación de fosfato y el nivel de virulencia conferido por las proteínas Chr.

11.2.3 Efecto de la concentración de la glucosa del medio en la virulencia conferida por los genes *chrA*

La glucosa es empleada por las bacterias como fuente de carbono, además de que su nivel regula diversas rutas metabólicas. Por lo que se evaluó el efecto de la concentración de glucosa en la virulencia conferida por los genes *chr*. El aumento de la concentración de glucosa en el medio de cultivo (111 mM), generó un aumento de toxicidad de los sobrenadantes de *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 38), sin embargo, no modificó el nivel de virulencia conferido por los genes *chr*. Por lo cual podemos observar

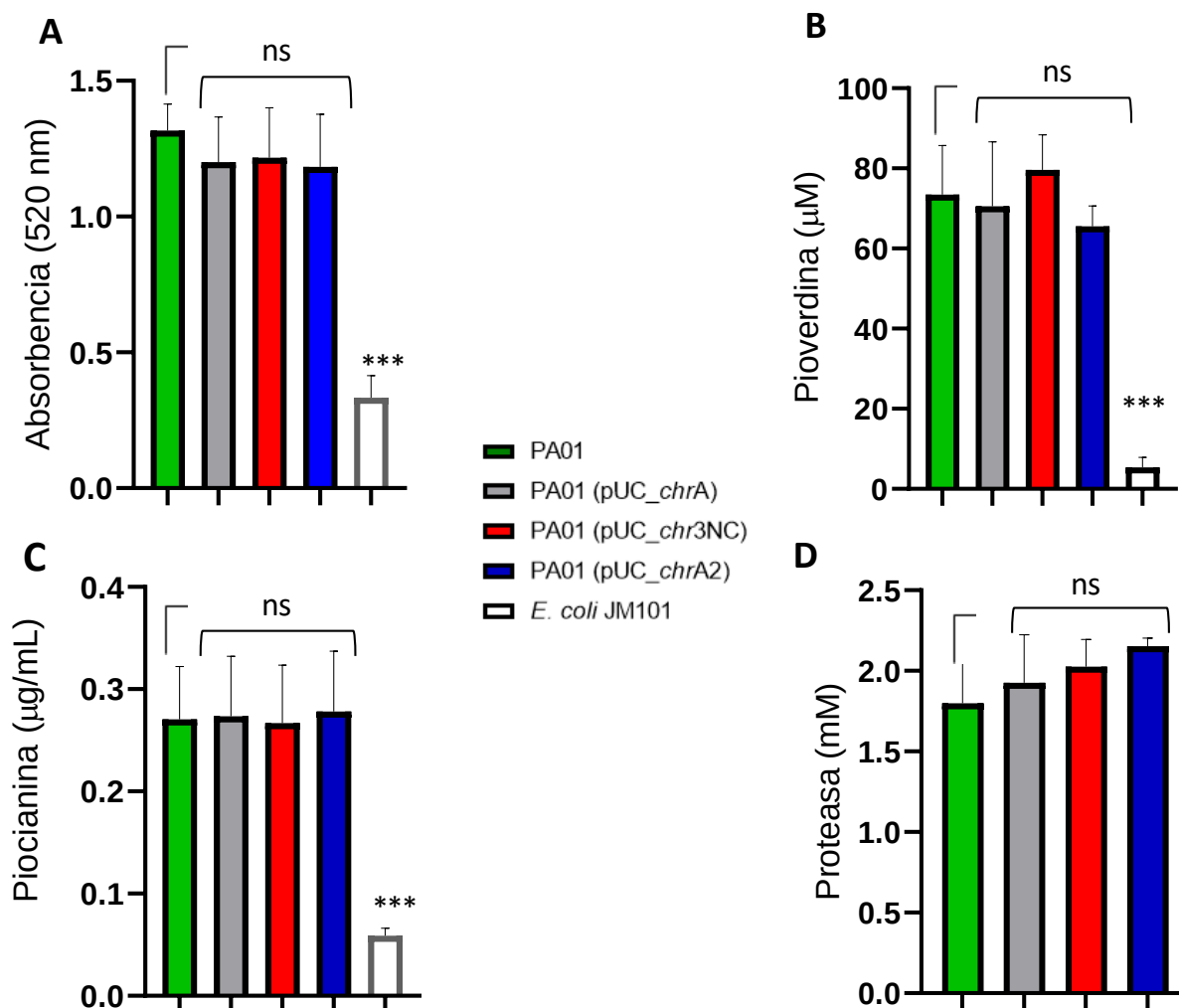


Figura 36. Cuantificación de factores de virulencia de *P. aeruginosa*. Ensayos realizados con las cepas crecidas en medio M9 durante 22 h a 37 °C. **A.** Cuantificación de producción de biopelícula. **B.** Cuantificación de producción de pioverdina. **C.** Cuantificación de producción de piocianina. **D.** Cuantificación de producción proteasa. *E. coli* JM101 usado como control negativo. N=3 (por duplicado, se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$ y ns no significativo.

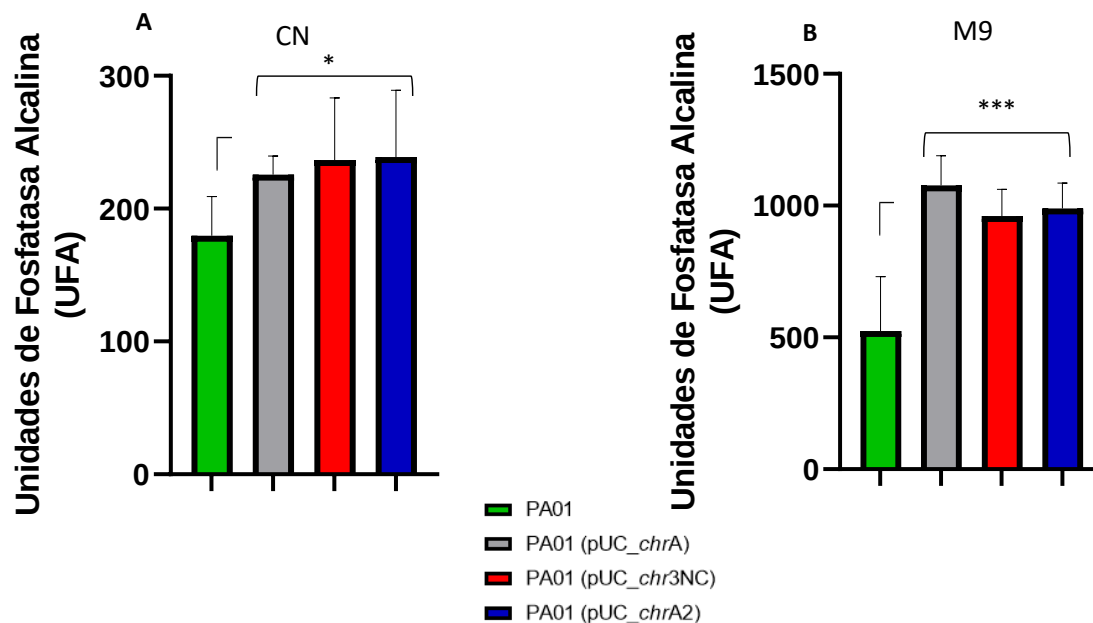


Figura 37. Cuantificación de los niveles de fosfatasa alcalina en las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr*. Ensayos realizados con las cepas crecidas en **A. medio CN durante 18 h a 37°C. **B.** medio M9 durante 22 h a 37°C. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett * $p < 0.05$, Dunett *** $p < 0.001$.**

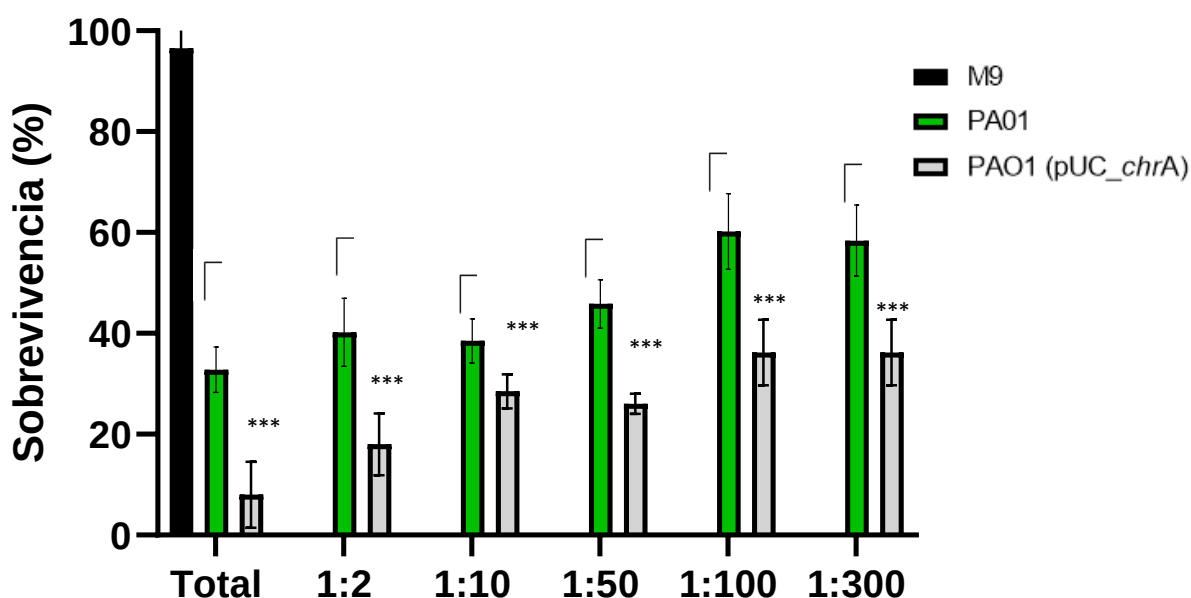


Figura 38. Toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con incremento de glucosa en el medio. Medio M9 usado como control negativo. Se incubaron 20 nematodos con diferente dilución (1:2, 1:10, 1:50, 1:100 o 1:300) o el sobrenadante total obtenido de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y *P. aeruginosa* (pUC_chrA) con 111 mM de glucosa en el medio. Se representa la sobrevivencia de los nematodos obtenida a las 42 h posincubación. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$.

que la glucosa no posee un efecto en el aumento de toxicidad de los sobrenadantes generado por la presencia de los genes *chr*.

11.2.4 Efecto de la toxicidad de los sobrenadantes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr* tratados con ditioneitol (DTT)

Para conocer otra característica de la molécula tóxica, se realizaron ensayos de toxicidad agregando DTT a los sobrenadantes obtenidos de las cepas que contiene los genes de resistencia al cromo hexavalente, ya que este es un agente reductor, el cual rompe los enlaces disulfuro de las moléculas.

Este ensayo, se realizó con los sobrenadantes totales, así como con la dilución de estos (1:300) (Fig. 39 A). Como resultado obtuvimos que los sobrenadantes de las cepas con los genes de interés disminuyen su toxicidad, y se muestra que el porcentaje de sobrevivencia del modelo de gusano empleado no difiere al obtenido con la cepa control (~ 80% de sobrevivencia) medido al final del ensayo.

El mismo efecto se observa en el experimento realizado con los sobrenadantes totales tratados con DTT (Fig. 39 B), se pudo observar como todos los sobrenadantes disminuyen su toxicidad, y los sobrenadantes correspondientes a las cepas con los genes *chr*, generan menor muerte de los nematodos y muestra el mismo nivel de toxicidad que los sobrenadantes de la cepa control, el cual es de ~ 80% de sobrevivencia a las 42 h.

Con los resultados anteriores, podemos decir que la molécula que está causando un aumento en la toxicidad podría ser una proteína o un péptido con enlaces disulfuro.

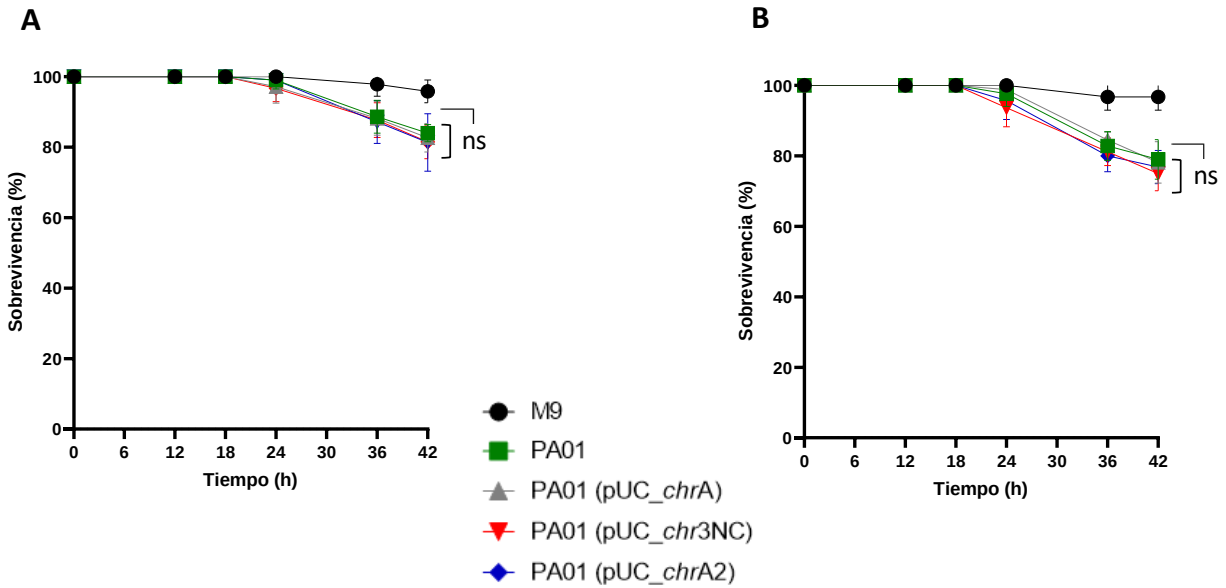


Figura 39. Toxicidad de los sobrenadantes y el efecto del tratamiento con DTT de las cepas de *P. aeruginosa* con los genes *chrA*, *chr3NC* y *chrA2*. Ensayos realizados con los sobrenadantes obtenidos de las cepas crecidas en medio M9 tratados con DTT (0.5 μ M) **A.** toxicidad de los sobrenadantes diluidos (1:300). **B.** toxicidad de los sobrenadantes totales. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett ns no significativo.

11.2.5 Cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante de la cepa de *P. aeruginosa* con el gen *chrA*

Para conocer el tamaño aproximado de la molécula probablemente secretada por las proteínas Chr relacionada con el aumento de la toxicidad, se llevó a cabo fraccionamientos moleculares del sobrenadante obtenido del cultivo de *P. aeruginosa* (pUC_ *chrA*).

Primeramente, se realizó una cromatografía con una columna de punto de corte de 3 kiloDaltons (kDa), obteniendo dos fracciones del sobrenadante, una con moléculas de un tamaño menor a 3 kDa (fracción <3 kDa) y otra con un tamaño mayor a 3 kDa (fracción >3 kDa), ambas fracciones fueron empleadas en ensayos de toxicidad. Los resultados mostraron que la fracción >3 kDa fue tóxica para los nematodos, mostrando valores de sobrevivencia de los nematodos de ~50% similar al sobrenadante no fraccionado de *P. aeruginosa* (pUC_ *chrA*) (Fig. 40). Mientras que la fracción <3 kDa mostró una toxicidad similar a la del sobrenadante de la cepa *P. aeruginosa* PAO1 (~80% de sobrevivencia). Estos datos indican que la molécula que confiere la virulencia tiene un tamaño superior a los 3 kDa.

Posteriormente se realizó una segunda cromatografía con una columna de punto de corte de 30 kDa, de la cual se volvieron a obtener dos fracciones, una con moléculas de tamaño menor a 30 kDa (fracción <30 kDa) y otra con moléculas de tamaño mayor a 30 kDa (fracciones >30 kDa). Los resultados de toxicidad empleando ambas fracciones mostraron que la fracción <30 kDa disminuyó la sobrevivencia de los nematodos de manera similar al sobrenadante no fraccionado de *P. aeruginosa* (pUC_ *chrA*) (Fig. 41). Mientras que la fracción >30 kDa, no fue tóxica y generó el mismo porcentaje de los

nematodos incubados con el sobrenadante de la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (Fig. 41). En conjunto estos resultados sugieren que la(s) molécula(s) que participa(n) en la toxicidad conferida por las proteínas Chr posee(n) un tamaño entre los 3 y 30 kDa.

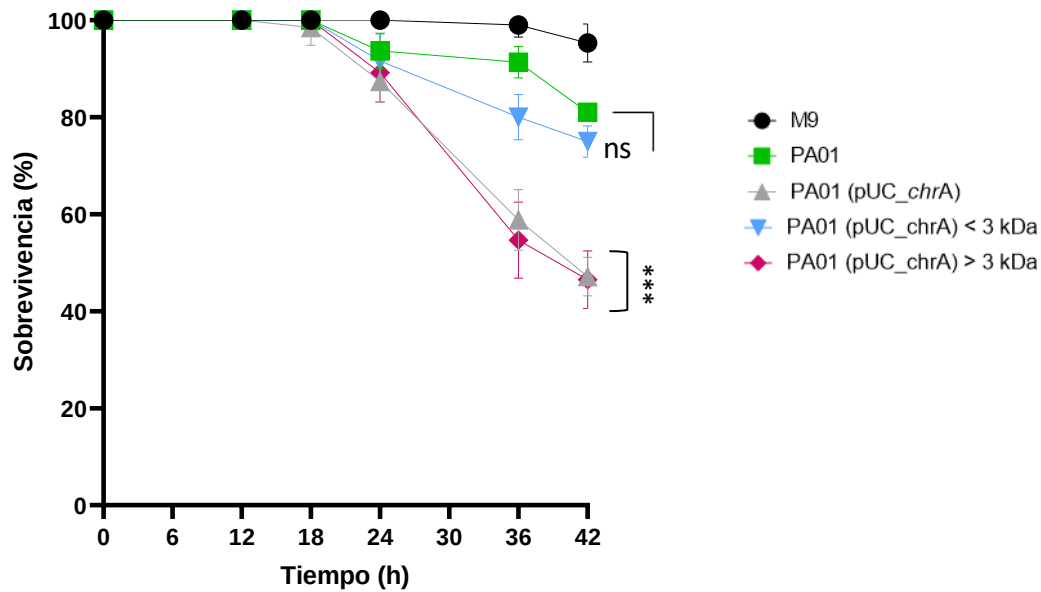


Figura 40. Toxicidad con el sobrenadante fraccionado (punto corte 3 kDa). Ensayos realizados con las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante de las cepas crecidas en medio M9. Las fracciones obtenidas fueron diluidas 1:300 en medio M9. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo. N=3 (por duplicado), se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$ y ns no significativo.

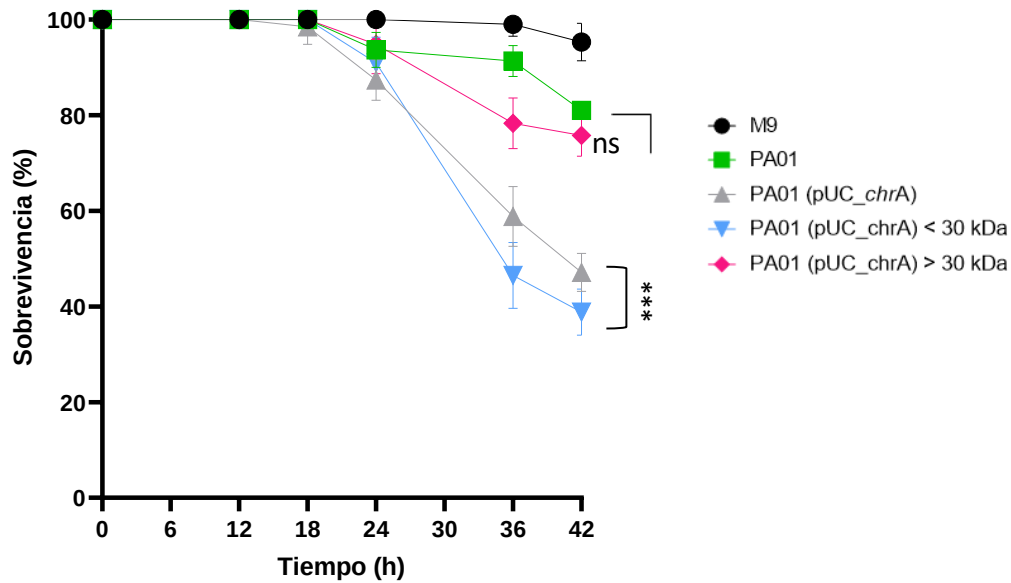


Figura 41. Toxicidad de las fracciones de la cromatografía con punto de corte de 30 kDa del sobrenadante. Ensayos realizados con las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular del sobrenadante de las cepas crecidas en medio M9. Las fracciones fueron diluidas 1:300. Medio M9 usado como control negativo. Se colocaron 20 nematodos por pocillo, N=3 (por duplicado). Se muestra el promedio de tres experimentos independientes, las barras corresponden a la desviación estándar. Los datos se analizaron con la prueba Dunett *** $p < 0.001$ y ns no significativo.

12 Discusión

A través de los años, las bacterias han sido capaces de desarrollar diferentes mecanismos de resistencia a metales pesados y compuestos tóxicos para la célula, como son las bombas de eflujo, las cuales expulsan de manera activa el ion tóxico desde el citoplasma o el espacio periplasmático hacia el exterior de la célula, manteniendo así concentraciones intracelulares no letales (Silver y Phung, 2005). Además de que estos mecanismos pueden conferir ventajas de selección, ha sido asociado con una mayor capacidad de las bacterias para colonizar y favorece la persistencia bacteriana en ambientes hostiles (Cervantes y col., 1994).

La proteína ChrA codificada por el plásmido pUM505, ha sido ampliamente estudiada por conferir resistencia al ion tóxico cromato, mediante la expulsión de la molécula (Cervantes y col., 1990; Álvarez y col., 1999). Algunos sistemas de resistencia basados en la expulsión de los compuestos tóxicos son conferidos por proteínas relativamente inespecíficas, tal es el caso de las proteínas CzcR-CzcS de eflujo de *P. aeruginosa*, las cuales son proteínas de expulsión de metales pesados como el zinc, cadmio y cobalto, sin embargo, también confieren resistencia a antibióticos carbapenémicos (Perron y col., 2004). Además, el sistema MexAB-QPrM de *P. aeruginosa*, que confiere resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacina (antibióticos del grupo de las quinolonas), también contribuye en la resistencia a compuestos tóxicos como bromuro de etidio un compuesto que se intercala en la estructura del DNA generando mutaciones o muerte (Xu y col., 2003).

La proteína ChrA de pUM505 forma parte de las proteínas de la superfamilia de resistencia a cromato CHR, un grupo de proteínas ancestrales que están ampliamente

distribuidas en los tres reinos (*Archaea*, *Bacteria* y *Eukarya*) sugiriendo un origen antiguo para la superfamilia CHR (Díaz-Pérez y col., 2007). La distribución de las proteínas CHR sugiere que estas tienen una función importante para las bacterias, por lo que la participación de ChrA en la virulencia podría sugerir que estas proteínas han permanecido a lo largo de la evolución dado a su importancia para las bacterias.

B. xenovorans LB400 es una bacteria que contiene en sus genomas varios homólogos CHR, posee cuatro homólogos LCHR (ChrA1a, ChrA1b, ChrA2 y ChrA6) y dos homólogos SCHR (Chr1NCa y Chcr1NCb), los genes *chr* que codifican a estas proteínas homologas se expresan diferencial en *B. xenovorans* y confieren diferente nivel de resistencia a cromato al ser transferidas a *E. coli*. La proteína ChrA2 es codificada en el megaplásmido de *B. xenovorans* LB400 y es la que tiene la principal participación en la resistencia a cromato (Díaz-Pérez y col., 2007; Reyes-Gallegos y col., 2016). Respecto a las proteínas de la familia SCHR generalmente estas proteínas son codificadas por un par de genes *chr* contiguos las cuales se sugiere se unen para dar lugar a una proteína funcional (Díaz-Pérez y col., 2007). En *Bacillus subtilis* 168, los genes *ywrB* y *ywrA* que se encuentran adyacentes y traslapados codifican a un par de proteínas SCHR denominadas Chr3N y Chr3C, respectivamente, las cuales cuando fueron clonadas y transferidas de manera conjunta a *E. coli* W3110 confirieron resistencia a cromato (Díaz-Magaña y col., 2009). Las proteínas Chr de *B. xenovorans* y el par de proteína ChrA3NC confieren resistencia a cromato, al igual que la proteína ChrA de pUM505, sugiriendo que esta familia de proteínas se ha preservado en las bacterias dado a su rol en la resistencia a cromato.

Recientemente, se determinó que la proteína ChrA de pUM505, además de conferir resistencia a cromato incrementa la virulencia y la toxicidad de *P. aeruginosa* (Valerio-Arellano, datos sin publicar). Dado al rol conservado entre las proteínas de la familia CHR en la resistencia a cromato, en este trabajo se evaluó la participación de las proteínas ChrA2 (una proteína de la familia LCHR) y del par Chr3NC (par de proteínas de la familia SCHR) en la virulencia.

Primeramente, se evaluó la resistencia conferida por los genes *chr* en *P. aeruginosa* PAO1 observando que solo la proteína ChrA2 confirió resistencia. La resistencia conferida por la proteína ChrA2 había sido evaluada previamente en 2016 por Reyes-Gallegos en *P. aeruginosa* PAO1, obteniendo resultados similares en los cuales la proteína ChrA2 confirió resistencia (Figs. 11 A y B). La participación del par de proteínas Chr3NC solo había sido evaluada en *E. coli* W3110, por lo que el par de genes fue transferido a *P. aeruginosa* PAO1; sin embargo, estos genes no confirieron resistencia a cromato. El género *Burkholderia* tiene más parecido genotípicamente con el género de *Pseudomonas*, lo que puede explicar por qué solo este homólogo fue funcional en *P. aeruginosa* PAO1 como huésped heterólogo.

El análisis de la virulencia de las transformantes mostro que ambas proteínas ChrA2 y Chr3NC incrementaron la virulencia y la toxicidad de *P. aeruginosa* PAO1 al igual que ChrA de pUM505 (Figs. 14 y 15), sugiriendo que las proteínas Chr además de su función en la resistencia a cromato participan en la virulencia de las bacterias. Interesantemente, a pesar de que los genes *chr3NC* no son funcionales para conferir resistencia a cromato si incrementaron la virulencia y toxicidad de la bacteria (Figs. 14 y 15).

Los *chr3NC* y *chrA2* habían sido caracterizados previamente en *E. coli* W3110 mostrando ser funcionales en este huésped (León-Márquez, y col., 2009; Díaz-Magaña y col., 2009) por lo que estos genes fueron transferidos a la cepa de *E. coli* JM101, sin embargo, las transformantes los genes *chr* mostraron el mismo nivel de resistencia a cromato que la cepa de *E. coli* JM101, indicando que estos genes no son funcionales en este fondo genético (Fig. 12). Aunque los genes *chr* fueron transferidos a una cepa de *E. coli* se ha descrito que bacterias de diferentes subgrupos dentro de una misma especie bacteriana pueden poseer características de genotipo y fenotipo que las distinguen de otros subgrupos, lo que puede generar cambios en la fisiología de la bacteria, lo que puede explicar porque los genes *chr* no fueron funcionales en *E. coli* JM101. Un resultado similar fue reportado por Cervantes y col. (1990) quienes reportaron que la transferencia de la proteína *chrA* de pUM505 a *E. coli* no confirió resistencia a cromato, sugiriendo que podría deberse a alguna barrera transcripcional o a la incapacidad de los productos proteicos para funcionar en la membrana de *E. coli*.

Por otro lado, las proteínas Chr son proteínas integrales de membrana, las proteínas ChrA y ChrA2 son codificadas en el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* y en el megaplásmido de *B. xenoborans* LB400, respectivamente, y ambas bacterias son Gram negativas, mientras que el par de proteínas Chr3NC es codificado en el genoma de *B. subtilis* 168 que es una bacteria Gram-positiva, por lo que las diferencias que poseen ambos grupos bacterianos en la estructura de su membrana podría tener algún efecto en la capacidad de las proteínas Chr en la resistencia a cromato, no así en la virulencia.

La participación en la virulencia de genes que confieren resistencia a metales ha sido previamente reportada, tal es el caso de la proteína CzcR de *P. aeruginosa*, la cual es una proteína reguladora de las proteínas CzcCBA que se encargan de expulsar metales como el Zn. La proteína CzcR incrementa la expresión de genes de virulencia como los que codifican para biopelícula y elastasa, sin embargo, la participación de esta proteína en la virulencia es por la regulación de la expresión de genes de virulencia (Perron y col., 2004).

Dado que en bacterias la entrada de cromato hacia el citoplasma esta mediada por las proteínas transportadoras de sulfato (Aguilar-Barajas y col., 2008), se evaluó el efecto de la concentración de sulfato del medio de cultivo en la resistencia a cromato de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr3NC* y *chrA2*. Se observó que la resistencia a cromato de todas las bacterias incrementa al aumentar la concentración de sulfato en el medio, mientras que las bacterias son más susceptibles al ion al ser crecidas en baja concentración de sulfato (Fig. 18 A, B y C), un resultado previamente esperado, pues se ha descrito que ambos oxianiones compiten por el ingreso a través de los transportadores y que la concentración de sulfato repercute en el fenotipo de toxicidad generado por la presencia de cromo (Aguilar-Barajas y col., 2008).

Por lo que posteriormente se evaluó el efecto del sulfato del medio en la virulencia y toxicidad conferida por los genes *chr*. Primeramente, se observó que la concentración de sulfato en el medio modifica la virulencia y toxicidad conferida por los genes *chr*, la disminución de sulfato disminuyó la virulencia y toxicidad de las bacterias (Fig. 19), sugiriendo que el sulfato participa de manera importante en las funciones de resistencia a cromato y de virulencia conferida por las proteínas Chr (Fig. 20).

El fosfato es un elemento importante para las células y en *P. aeruginosa* PAO1 el aumento de fosfato modifica la expresión de genes relacionados con la virulencia como la pioverdina, así como de algunas bombas de eflujo (Zaborin y col., 2012). Por otro lado, el ion fosfato posee una estructura química tetraédrica similar al sulfato y cromato por lo que su efecto en la virulencia por las proteínas Chr fue evaluado. El nivel de virulencia y toxicidad conferida por las proteínas CHR fue levemente incrementado por un aumento de fosfato en el medio de cultivo (Fig, 21), sugiriendo la participación de este ion en la virulencia, pero al momento desconocemos el mecanismo de esta respuesta.

El mecanismo *Quorum sensing* controla la expresión de múltiples factores de virulencia de *P. aeruginosa*, así como la formación de biopelícula y su difusión, el cual es uno de los mecanismos más importantes para la colonización y la resistencia a antibióticos en esta bacteria (Qiaoqiang y col., 2022). Con el propósito de evaluar la participación del QS en la virulencia y toxicidad conferido por las proteínas Chr, los genes *chrA*, *chrA2* y *chr3NC* fueron transferidos a *P. aeruginosa* PAO1 Δ lasI/rhlI, una mutante en el QS. Las proteínas ChrA y ChrA2 mostraron no ser moduladas por el QS confiriendo el mismo fenotipo de resistencia a cromato, virulencia y toxicidad que cuando fueron transferidos a la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 (Figs. 11, 14, 15, 22 y 23). Sin embargo, el fenotipo de resistencia a cromato conferido por el par de genes *chr3NC* fue modificado en la mutante del QS, los genes *chr3NC* confirieron resistencia a cromato en medio M9 (Fig. 22), pero la virulencia y la toxicidad conferida por estos genes no fue modificada (Fig. 23), sugiriendo que el QS regula negativamente la expresión de los genes *chr3NC* en presencia de cromato.

Como se ha descrito anteriormente la proteína ChrA es una proteína de membrana que en presencia de cromato expulsa a este ion hacia el periplasma a través de un mecanismo dependiente del potencial de membrana (Pimentel y col., 2002), sugiriendo que en el caso de la virulencia y toxicidad ChrA podría expulsar alguna molécula de virulencia. La función de las proteínas Chr en la virulencia y toxicidad se determinó empleando cultivos crecidos en presencia de KCN, un inhibidor del potencial de membrana (Pimentel y col., 2002). El nivel de resistencia a cromato conferido por las proteínas Chr disminuyó en presencia de KCN (Fig. 24). confirmando lo reportado para la proteína ChrA, de que la expulsión del cromato conducido por la proteína es dependiente del potencial de membrana. La adición de una concentración subinhibitoria de KCN no afectó el crecimiento de las bacterias, pero generó la pérdida de la virulencia y toxicidad de las transformantes de *P. aeruginosa* con los genes *chr* (Fig. 25), sugiriendo que la virulencia y toxicidad conferida por las proteínas Chr ocurre a través de un mecanismo de expulsión de moléculas de virulencia, expulsión que depende del potencial de membrana. Además de que este fenómeno es dependiente de la concentración de KCN empleado (Figs. 26 y 27).

El Cr (VI) es un ion que al ingresar al citoplasma e interactuar con compuestos celulares es capaz de generar especies reactivas de oxígeno (ERO) generando estrés oxidativo (Cervantes y col., 2011), sugiriendo que la expulsión activa del cromato por las proteínas ChrA disminuye la generación de ERO dado a la disminución del ion en el citoplasma (Cervantes y col., 1990; Álvarez, y col., 1999). Con el propósito de evaluar el probable mecanismo a través del cual las proteínas Chr aumentan la virulencia y toxicidad en *P. aeruginosa* y su relación con ERO, se realizó la adición de NAC, un

agente neutralizante de las ERO mediante la transferencia de un electrón de su grupo a las moléculas oxidadas (Zafarullah y col., 2003), a los medios de cultivo. El efecto tóxico del cromato disminuyó en presencia de NAC para todas las bacterias (Fig. 28). Mientras que la virulencia y toxicidad conferida por las proteínas Chr también disminuyó por la presencia de NAC (Fig. 29), sugiriendo que las ERO poseen un papel importante en la virulencia y toxicidad conferida por las proteínas Chr. Existen reportes que indican que las ERO incrementa la producción de diversos factores de virulencia como elastasa, exotoxinas y biopelícula en *P. aeruginosa* (Liu y col., 2016), por lo que puede sugerirse que la expresión de las proteínas Chr favorecen la producción de las ERO. Como el cromo es un inductor de estrés oxidativo (Cervantes y col., 2007), se evaluó el efecto del cromato en la virulencia conferida por las proteínas Chr observando que el cromo aumenta el nivel de virulencia conferido por las proteínas Chr (Fig. 30), reforzando la idea de la participación de las ERO en la virulencia y toxicidad conferida por las proteínas Chr.

La producción de H_2O_2 , como molécula indicadora de los niveles de ERO (Cuz y col., 2021), fue favorecida por la transferencia de los genes *chrA*, *chr3NC* y *chrA2* (Tabla 6), sugiriendo nuevamente la participación del estrés oxidativo en el mecanismo de virulencia y toxicidad conferido por las proteínas Chr.

P. aeruginosa es una bacteria aerobia, además, se ha observado que los organismos que son más virulentos necesitan generar una mayor cantidad de ATP para la producción de diversos factores de virulencia, tal es el caso de esta bacteria en donde el aumento de la expresión de genes relacionados con la virulencia también aumenta la utilización de múltiples fuentes de nutrientes (Son y col., 2007). La tasa de consumo de oxígeno es un reflejo de la actividad metabólica aerobia de las células. A pesar de que

el incremento de glucosa en el medio de cultivo no afectó la toxicidad conferida por las proteínas Chr (Fig. 38), el consumo de oxígeno aumentó en *P. aeruginosa* PAO1 por la transferencia de los genes *chr* (Fig. 31). Además, el cromato también incremento el consumo de oxígeno de todas las cepas, incluso en ausencia de algún gen *chr*. Esto sugiere que la expresión de los genes *chr* favorece el metabolismo oxidativo de las bacterias, probablemente como consecuencia de un mayor uso de ATP para la función de expulsión; pero también sugiere un aumento en los niveles de ROS, como consecuencia del incremento de la transferencia de electrones a través de la cadena de transporte de electrones.

Como fue descrito anteriormente el cromato incrementó la virulencia y toxicidad conferida por las proteínas Chr, así como el consumo de oxígeno de todas las bacterias, además, el cromato incrementó los niveles de expresión de los genes *chr3NC* y *chrA2* (Fig. 32), sugiriendo que este ion actúa como un inductor de la expresión de los genes *chr*.

La bacteria de *P. aeruginosa* posee un amplio repertorio de factores de virulencia que utiliza para infectar a sus huéspedes. Los factores se encuentran relacionados con la capacidad de la bacteria para producir infecciones, estos le permiten adquirir nutrientes del medio, traspasar las barreras naturales de defensa, así como, evadir la respuesta inmune de los huéspedes (Azam y Khan, 2019). La producción de factores de virulencia como piocianina, pioverdina y biopelícula de *P. aeruginosa* PAO1 no se modificó por la expresión de los genes *chr* (Fig. 36), sugiriendo que las proteínas Chr confieren virulencia a través de un mecanismo o molécula diferente a las evaluadas; sin embargo, la actividad de proteasa alcalina se incrementó en presencia de los genes *chr* (Fig. 37). La proteasa

alcalina es una enzima de secreción que rompe los enlaces fosfato diferentes moléculas durante condiciones de estrés (Rashid y Kornberg, 2000). En *P. aeruginosa* la fosfatasa alcalina LapA se ha asociado con la virulencia y la capacidad producción de biopelícula, aunque aún no se tiene claro su mecanismo y su producción se ha asociado con la baja concentración de fosfato en el medio (Tan y col., 2021).

Para conocer características de la molécula probablemente secretada por las proteínas Chr, el sobrenadante fue tratado con proteasa R, calor y adición de DTT, y todos los tratamientos generaron una disminución en la toxicidad de los sobrenadantes de las cepas con los genes *chr* (Figs. 33, 34, 35 y 39). El calentamiento afecta principalmente a las moléculas orgánicas, a baja temperatura las moléculas orgánicas pueden perder su estructura y actividad, mientras que las moléculas inorgánicas requieren de temperatura elevada para perder su actividad. La toxicidad del sobrenadante de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 con los genes *chr* se evaluó calentando las muestras durante 2 horas a 90°C (Fig. 33), sin embargo, los sobrenadantes mostraron perder su toxicidad al ser calentados a la misma temperatura, pero durante 5 min (Fig. 34), así como a 60°C por 2 horas (Fig. 35), sugiriendo que en la virulencia participa una molécula orgánica. Por otro lado, las proteasas son enzimas que rompen enlaces peptídicos y degradan a las proteínas (Pande y Sirvastava, 2019), por lo que la pérdida de la toxicidad de los sobrenadantes tratados con proteasa (Fig. 33) sugiere que la molécula probablemente secretada por las proteínas Chr es de origen proteico o bien posee enlaces peptídicos. Por lo que, además, los sobrenadantes fueron tratados con DDT un agente reductor que rompe los enlaces disulfuro de las proteínas ocasionando pérdida de su función, por lo que la pérdida de virulencia y toxicidad

conferida por las proteínas Chr (Fig. 39) sugiere que la(s) molécula(s) relacionada con la virulencia probablemente secretada por las proteínas Chr corresponde a una proteína. Finalmente, con el propósito de determinar el tamaño de la(s) molécula(s) los sobrenadantes fueron fraccionados empleando columnas de cromatografía de 3 y 30 KDa como punto de corte y las fracciones que mantuvieron la toxicidad del sobrenadante del cultivo de *P. aeruginosa* (pUC_ *chrA*) fueron las de >3 y <30 kDa (Figs. 40 y 41), sugiriendo que la molécula tiene un tamaño entre este rango.

Estos datos indican que las proteínas ChrA2 de *B. xenovorans* LB400 y Chr3NC de *B. subtilis* 168, pertenecientes a las subfamilias LCHR y SCHR, respectivamente, participan en la virulencia y toxicidad de las bacterias, al igual que la proteína ChrA sugiriendo que las proteínas de la superfamilia CHR poseen una función en la virulencia de las bacterias.

13 Conclusión

Las proteínas Chr3NC (*B. subtilis* 168) pertenecientes a la familia SCHR, así como las proteínas ChrA2 (*B. xenovorans* LB400) y ChrA (*P. aeruginosa*) de la familia LCHR de la súperfamilia CHR, además de funcionar como un mecanismo de resistencia a cromato, participan en el aumento de virulencia en la bacteria de *P. aeruginosa* por la probable expulsión de una(s) molécula(s) tóxica(s) de carácter proteico que tiene un peso molecular entre los 3 y 30 kDa.

14 Bibliografías

1. Aguilar-Barajas, E., Díaz-Pérez, C., Ramírez-Díaz, M., Riveros-Rosas, H. y Cervantes, C. (2011). Bacterial transport of sulfate, molybdate, and related oxyanions. *Biometals*. 24: 687-707.
2. Aguilar-Barajas, E., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, H., y Cervantes, C. (2008). Molecular mechanisms of bacterial resistance to metal and metalloid ions. *Biometals*. 21(3): 321-32.
3. Álvarez, A. H., Moreno, R., y Cervantes, C. (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *P. aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 181:7398-7400.
4. Alvarez, C., Braco, M. y Hernández, A. (2021). Hexavalent chromium: Regulation and health effects. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 65: 126729.
5. Azam, M. y Khan, A. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*. 24(1): 350-359.
6. Bachmann, B., Low, K. y Taylor, A. (1976). Recalibrate linkage of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. (40): 116-67.
7. Brooks, G. y col. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología (1ed.al.). México: CENIAG.
8. Boto, L. (2010). Horizontal gene transfer in evolution; facts and challeges. *Proceedings. Biological sciences*. 277(1683): 819-827.
9. Burrows, L. L., (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: Type IV in action. *Annual Review of Microbiology*. 66: 493-520.

10. Cassin, E. y Shan Tseng, B. (2019). Pushing beyond the envelope: The potential roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and pathogenicity. *Journal of Bacteriology*. 201(18): e00050-19.
11. Cervantes, C. (2017). Las proteínas CHR: una estrategia ancestral de las bacterias para tolerar la toxicidad del cromato. *Ciencia Nicolaita*. 71(97): 95-112.
12. Cervantes, C. Othake, H., Chu. L., Misra, T.K. y Silver, S. (1990). Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *Journal of Bacteriology*. 172 (5): 287-291.
13. Cervantes, C. y Campos, J. (2007). Reduction and efflux of chromate of bacteria. In: Nies, D.H., Silver, S. (eds.). *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Berlin: Springer-Verlag. 402-407.
14. Chaparro, J., Rogers, S. y Kolvenbach, B. (2004). Genome sequence of *Burkholderia xenovorans* LB400, a bacterium that degrades polychlorinated biphenyls. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 101(20): 8790-8795.
15. Chevalier, S., Bouffarrigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G. J., Orange, N., Dufour, A. y Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *Fems Microbiology Reviews*. 41(5): 698-722.
16. Coffey, B. y Anderson, G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. In *Pseudomonas aeruginosa Methods and Protocols*. Humman Press Inc. 1149: 631-641.

17. ICruz, W., Inkovskiy, V., Versey, Z., Strempel, N., Cassol, E. y Overhage, J. (2021). Oxidative Stress Response in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens*. 10: 1119 – 1187.
18. Cornellis, P., Dingemans, J. (2013). *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Frontiers of Cellular Infection Microbiology*. 3:75
19. Dauner, M. y Skerra, A. (2020). Scavenging Bacterial Siderophores with Engineered Lipocalin Proteins as an Alternative Antimicrobial Strategy. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*. 21(5): 601-606.
20. Díaz-Magaña, A., Aguilar-Barajas, E., Moreno-Sánchez, R., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, H., Vargas, E., y Cervantes, C. (2009). Short-chain chromate ion transporter proteins from *Bacillus subtilis* confer chromate resistance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 191(17), 5441–5445.
21. Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Campos-García, J., Julián-Sánchez, A., y Riveros-Rosas, H. (2007). Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *The FEBS journal*. 274(23): 6215–6227.
22. Galdino, A. C. M., Branquinho, M. H., Santos, A. L. y Viganor, L. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* and its arsenal of proteases: weapons to battle the host. *Pathophysiological aspect of proteases*. 381-397.
23. Gálvan, C., Tejeda, M. Camargo, A., Higuera, J., Mariscal, V. y Fernández, E. (SA). Aislamiento y purificación del DNA de un plásmido recombinante. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Rabanales.

24. Gellatly, S. L. y Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*. 67(3): 159-173.
25. González, O., Ortiz-Castro, R., Díaz-Pérez, C., Díaz-Pérez, A., Magaña- Dueñas, V., López-Bucio, J. y Campos-García, J. (2017). Non-ribosomal peptide synthases from *Pseudomonas aeruginosa* play a role in cyclodipeptide biosynthesis, Quorum-sensing regulation, and root development in a plant host. *Microbial Ecology*. 73(3): 616–629.
26. Hall, S., McDermott, C. Anoopkumar-Dujie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V., Davey, A. K., Chess-Williams, R., Kiefel, M. J., Arora, D. y Grant, G. D. (2016). Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*. 8(8): 236.
27. Helinski, D. R. (2022). A brief history of plasmids. *EcoSal Plus*. 10(1): Eesp-0028.
28. Hernández, K., Reyes, I., Chávez, V., Díaz, A., Meza, V. y Ramírez, M. (2018). A plasmid-encoded mobile genetic element from *Pseudomonas aeruginosa* that confers heavy metal resistance and virulence. *Plasmid*. 98: 15–21.
29. Horitsu, H., Nishida H. y Kato, H. (1978). Isolation of potassium chromate-tolerant bacterium and chromate uptake by the bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*. 42: 2037-2043.
30. Hossini, H., Shafie, B., Niri, A., Nazari, M., Esfahlan, A., Ahmadpour, M., Nazmara, Z., Ahmadimanesh, M., Makhdoumi, P., Mirzaei, N., y Hoseinzadeh, E. (2022). A comprehensive review on human health effects of chromium: insights on induced toxicity. *Environmental Science and Pollution Research International*. 29(47): 70686–70705.

31. Jarama, B. (2022). Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* productora de metalcarbapenemasas aisladas del Hospital Nacional Hipólito Unanue en el año 2016. Tesis de maestría.
32. Kadiiska, M.B., Xiang, Q. H. y Mason, R.P. (1994). In vivo free radical generation by chromium (IV): an electron spin resonance spin-trapping investigation. *Chemical Research in Toxicology*. 7:800-805.
33. Kariminik, A., Baseri-Salehi, M. y Kheirkhah, B. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: an update review article. *Immunology letters*. 190: 1-6.
34. Katz, S. A. y Salem, H. (1993). The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *Journal of Applied Toxicology*. 13:217-224.
35. Laarman, A. J., Bardoel, B. W., Ruyken, M., Fernie, J., Milder, F. J., Van Striip, J. A. y Rooijakkers, S. H. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. *The Journal of Immunology*. 188(1): 386-393.
36. Langendonk, R. F., Neill, D. R. y Forthergill, J. L. (2021). The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for current resistance-breaking therapies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 11: 665759.
37. Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., y Zhang, L. H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nature chemical biology*. 9(5): 339-343.

38. Lee, J. y Zhang, L. (2015). The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein and Cell*. 6(1): 26-41.
39. Lee, K. y Yoon, S. S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 1053-1064.
40. Lee, S. Gallagher, L., y Manoil, C. (2010). Restructuring a Wild-Type *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PAO1. *Journal of Bacteriology*. 203(14), e0017921.
41. León-Márquez, Y. (2009). Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR. Tesis de maestría. IIQB-UMSNH.
42. Li, L., Malone, J. y Iglewski, B. (2007). Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. *Journal of Bacteriology*. 189:4367-4374.
43. Liu, Y., Ziemba, R. y Deretic, V. (1996). Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors by reactive oxygen intermediates. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 93(2): 425-429.
44. Liyama, K., Takahashi, E., Lee, J. M., Mon, H., Morishita, M., Kusakabe, T. y Yasunaga-Aoki, C. (2017). Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS microbiology letters*. 364(7): fnx051.
45. Lujan, D. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*. 48(4): 465-474.

46. Martínez, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
47. Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K. y Takana, R. (2004). Quantitative PCR with 16S rRNA gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(1): 167-173.
48. 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. *Clinical Microbiology*. 4: 191- 206.
49. Menzenvec, R. y Gibbons, C. (2023). Interactions between chromium species and DNA *in vitro* and their potential role in the toxicity of hexavalent chromium. *Metallomics*. 15(8): mfad045.
50. Mertz, W. (1969). Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiological Reviews*. 49: 162-239.
51. Michalska, M. y Wolf, P. (2015) *Pseudomonas* Exotoxina A: Optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in microbiology*. 6: 963.
52. Nadal, P., Koch, G., Thompson, J., Xavier, K., Cool, R., y Quax, W. (2012). The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(1): 46-65.
53. Niikura, M., Atobe, S., Takahashi, A., Kado, Y., Sugimoto, T., Tsuji, H., Shimizu, K., Ogura, H. y Asahara, T. (2021). Development of a rapid and sensitive analytical

- system from *Pseudomonas aeruginosa* based on reverse transcription quantitative PCR targeting of rRNA molecules. *Emerging Microbes & Infections*. 10: 677-686.
54. Oliver, A. y Nicolau, C. (2010). Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. 28(1): 19-28.
55. O'Loughlin, C., Miller, L., Siryaporn, A., Drescher, K., Semmelhack, M. y Bassler, B. (2013). A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110(44): 17981-6.
56. Ohtake, H., Cervantes, C. y Silver, S. (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescence* carrying a chromate resistance plasmid. *Journal of bacteriology*. 69: 3853-3856.
57. Pande, M. y Srivastava, R. (2019). Molecular and clinical insights into protein misfolding and associated amyloidosis. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 187: 111753.
58. Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. y Cheng, Z. (2019). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* mechanism and altirve therapeutic strategies. *Biotechnology advances*. 37(1): 177-192.
59. Pardee, A. (1966). Purification and properties of a sulfate-binding proteina from *Salmonella typhimurium*. *The Journal of biological chemistry*. 241(24): 5886-5892.
60. Pavesi, T. y Costa, J. (2020). Mechanism and individuality in chromium toxicity in humans. *Journal of Applied Toxicology*. JAT, 40(9): 1183-1197.

61. Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S. y Vázquez R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista chilena de Infectología*. 36(2): 180-189.
62. Peix A, Ramírez-Bahena MH, Velázquez E. (2009). Evolución histórica y estado actual de la taxonomía del género *Pseudomonas*. *Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 9(6): 1132-47.
63. Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J. L., y Kohler, T. (2004). CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*. 279(10): 8761-8768.
64. Piddock, L. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 4: 629-636.
65. Qiaoqiang, L., Shen, M., Hong, W. y Xinye, Y. (2022). The Molecular Architecture of *P. aeruginosa* Quorum- Sensing Inhibitors. Review. *Mar Drugs*. 20(8): 488.
66. Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros.Rosas, H. Campos-García, J., Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance of chromium compounds. *Biometals*. 21:321-332.
67. Rashid, M. y Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(9): 4885-4890.

68. Reyes-Gallegos, R. I., Ramírez-Díaz, M. I. y Cervantes, C. (2016). *chr* genes from adaptative replicons for chromate resistance by *Burkholderia xenovorans* LB400. *World journal of microbiology & biotechnology*. 32(3): 45.
69. Rodríguez, E., Hernández, K., Díaz S., Díaz, A., Chávez M., Meza, V., Ortiz R., Cervantes, C. y Ramírez, M. (2016). Genes from pUM505 plasmid contribute to *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 109(3):389-96.
70. Ruíz, L. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis de doctorado, Universidad de Valencia.
71. Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. (2° ed). Cold Spring Harbor.
72. Shi, X. y Dalas, N.S. (1990). On the hidroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (VI) species. *Arch. Biochem*. 277:342-350.
73. Silver, S. y Phung, L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 32:587-605.
74. Singh, S., Wilksch, J. J., Dunstan, R. A., Mularski, A., Wang, N., Hocking, D., Jebeli, L., Cao, H., Clements, A., Jenney, A. W. J., Lithgow, T., y Strugnell, R. A. (2022). LPS O Antigen Plays a Key Role in *Klebsiella pneumoniae* Capsule Retention. *Microbiology spectrum*. 10(4): e0151721.
75. Smalla, K., Osborn, M. y Wellington, E. M. H. (2000). Isolation and characterization of plasmids from bacteria. *In horizontal Gene Pool*. CRC PREES. 234-273.

76. Stevens, T. C., Ochoa, C. D., Morrow, K. A., Robson, M. J., Prasain, N., Zhou, C., Alvarez, D. F., Frank, D. W., Balcozn, R., Stevens, T. (2014). The *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme Y impairs endothelial cell proliferation and vascular repair following lung injury. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*. 306(10): L915-L924.
77. Strateva, T. y Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Annals of microbiology*. 61(4): 717-732.
78. Superintendencia de Riesgos del Trabajo (SRT). (2019). Guía de actuación y diagnóstico por exposición a cromo hexavalente. Documento Oficial.
79. Son, M., Matthews, W., Kang, Y., Nguten, D. y Hoang, T. (2007). In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infection and immunity*. 75(11): 5313–5324.
80. Tan, X., Cheng, X., Hu, M., Zhang, Y., Jia, A., Zhou, J. y Zhu, G. (2021). Transcriptional analysis and target genes discovery of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm developed ex vivo chronic wound model. *AMB Express*. 11:57.
81. Thöming, J.G.; Tomasch, J., Preusse, M., Koska, M., Grahl, N., Phol, S., Willger, S. D., Kaefer, V., Müsken, M. y Häussler, S. (2020). Parallel evolutionary paths to produce more than one *Pseudomonas aeruginosa* biofilm phenotype. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 6(2).
82. Valle-Maldonado, M.I., Jácome-Galarza, I.E., Díaz-Pérez, A.L., Marínez-Cadena, G., Campos García, J., Ramírez-Díaz, M.I., Reyes-De la Cruz, H., Ríveros-Rosas, H., Díaz-Pérez, C. y Meza-Carmen, V. (2015). Phylogenetic analysis of fungal

heterotrimeric G. protein, encoding genes and their expression during dimorphism in *Mucor circinelloides*. *Fungal biology*. 119(12):1179-1193.

83. Van Schaik, E., Giltner, C. L., Audette, G., F., Keizer, D. W., Bautista, D. L., Slupsky, C. M. e Irvin, R. T. (2005). DNA binding: a novel function *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili. *Journal of bacteriology*. 187 (4): 1455-1464.

84. Wagener, B. M., Anjum, N., Christiaans, S. C., Banks, M. E., Parker, J. C., Threet, A. T. y Pittet, J. F. (2020). Exoenzyme Y contributes to end- organ dysfunction caused by *Pseudomonas aeruginosa pneumonia* in critically ill patients: an exploratory study. *Toxins*. 12(6): 369.

85. Wu, K., Mo, Y., Duan, M., Zheng, Y., Chang, Y., Ding, M., Wang, Z., Wu, S. y Duan, N. (2025). A Structure-Guided Bifunctional Aptamer Mitigates *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Biofilms by Disrupting *las* and *rhl* Quorum Sensing Systems. *Analytical chemistry*. 10.1021/acs.analchem.5c03245. Advance online publication.

86. Xu, N., Brownlow, W., Huang, S. y Chem, J. (2003) Single-molecule detection of efflux pump machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical and biophysical research communications*. 305(1): 79-86.

87. Yan, S. y Wu, G. (2019). Can Biofilm Be Reversed Through Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*?. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1582.

88. Zaborin, A., Gerdes, S., Holbrook, C., Liu, D., Zaborina, O. y Alverdy, J. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* Overrides the Virulence Inducing Effect of Opioids When It Senses an Abundance of Phosphate. *PLoS One*. 7(4): e34883.

89. Zafarullah, M., Li, W., Sylvester, J. y Ahmad, M. (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 60: 6-20.

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

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



A quien corresponda,

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

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

Datos del manuscrito que se presenta a revisión		
Programa educativo	Maestría en Ciencias en Biología Experimental	
Título del trabajo	Estudio del papel de proteínas homologas a ChrA de pUM505 de Pseudomonas aeruginosa en le virulencia	
	Nombre	Correo electrónico
Autor/es	Chavez Martinez Andrea	1415844f@umich.mx
Director	Ramírez Díaz Martha Isela	martha.ramirez@umich.mx
Codirector		
Coordinador del programa	Martínez Pacheco Mauro Manuel	mae.cs.biologia.experimental@umich.mx

Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Asistencia en la redacción	No	

Formato de Declaración de Originalidad y Uso de Inteligencia Artificial

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



Uso de Inteligencia Artificial		
Rubro	Uso (sí/no)	Descripción
Traducción al español	Si	busqueda de palabras desconocidas
Traducción a otra lengua	No	
Revisión y corrección de estilo	No	
Análisis de datos	No	
Búsqueda y organización de información	Si	Busqueda de sinonimos
Formateo de las referencias bibliográficas	No	
Generación de contenido multimedia	No	
Otro	No	

Datos del solicitante	
Nombre y firma	Chavez Martinez Andrea
Lugar y fecha	Morelia, Michoacán a 04 de marzo del 2026

Andrea Chávez Martínez

Estudio del papel de proteínas homologas a ChrA de pUM505 de Pseudomonas aeruginosa en la virulencia.docx

 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::3117:564393777

Fecha de entrega

6 mar 2026, 8:04 a.m. GMT-6

Fecha de descarga

6 mar 2026, 8:09 a.m. GMT-6

Nombre del archivo

Estudio del papel de proteínas homologas a ChrA de pUM505 de Pseudomonas aeruginosa en l....docx

Tamaño del archivo

17.3 MB

139 páginas

24.101 palabras

124.859 caracteres

17% Similitud general

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

Filtrado desde el informe

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

Fuentes principales

- 16%  Fuentes de Internet
- 8%  Publicaciones
- 0%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

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

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

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