



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

**“ANÁLISIS DE LOS GENES DE RESISTENCIA A ARSÉNICO
DE *Burkholderia xenovorans* LB400”**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Presenta:

Q.F.B. Nallely Serrato Gamiño

Asesor: D. C. Carlos Cervantes Vega.

Doctor en Ciencias Genómicas

Co-asesor: D C. Jesús Campos García

Doctor en Ciencias en Biotecnología

Morelia, Michoacán; Febrero 2018

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL D. C. CARLOS CERVANTES VEGA.

EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

A. RESUMEN

Las especies inorgánicas pentavalentes y trivalentes de Arsénico (As), As(V) y As(III), representan los compuestos más tóxicos de As y los más abundantes en la corteza terrestre. El As(III) actúa formando enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína, afectando la estructura y función de múltiples proteínas y enzimas; además puede generar especies reactivas de oxígeno al unirse al glutatión. Por otra parte, el As(V) debe su toxicidad a su analogía con el grupo fosfato, por lo tanto interrumpe su transporte y asimilación y desacopla la fosforilación de ADP, lo que conlleva a un impacto energético. El principal sistema bacteriano de resistencia a As radica en la reducción del As(V) a As(III) por acción de una arsenato reductasa (ArsC) y la posterior expulsión del As(III) a través de bombas membranales (ArsB/Acr3). Se han descrito diversos sistemas de resistencia a As en procariotas, no siendo el caso de *Burkholderia xenovorans* LB400, bacteria de genoma relativamente grande (9.73 Mpb) aislada de un suelo contaminado con bifenilos policlorados. LB400 ha sido estudiada por nuestro grupo de trabajo por sus múltiples genes de resistencia a cromato (*chr*).

Previamente se identificaron múltiples secuencias de probables genes *ars* en el genoma de LB400 y se demostró su resistencia a As, comparada con cepas estándar. Esto sugirió que los probables genes *ars* participan en la resistencia a los oxianiones de As. El objetivo de este trabajo fue determinar el papel de los múltiples genes *arsB* y *arsC* en la resistencia a As de LB400. Primeramente, se realizó un análisis filogenético donde se identificaron dos probables transportadores de As(III): Acr3 y ArsB, y cuatro probables arsenato reductasas ArsC1, ArsC2, ArsC3 y ArsC4. Acr3 y ArsC2 son codificados en el probable operón *arsRacrCH*. Posteriormente, los genes se clonaron y transfirieron a cepas de *Escherichia coli* mutantes en genes *ars* homólogos y a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Se encontró que el grupo de genes *arsRacrCH* y los genes *arsB* y *arsC4* confieren resistencia a As a las cepas transformantes. También se encontró que la resistencia de LB400 a As es inducida por ambos oxianiones de As. Finalmente, se encontró mediante RT-PCR que la expresión de los genes *arsR*, *arsC1* y *arsC4* se indujo en presencia de As(III), mientras que *arsC3* presentó una expresión basal en presencia y ausencia del oxianión. Para los genes *arsRacrCH* y *arsB* no se logró detectar la expresión. Estos resultados indican que los genes *acr3*, *arsB* y *arsC* presentes en el genoma de LB400 participan de forma diferencial en la resistencia a As.

Palabras clave: operón *ars*, resistencia a arsenato, resistencia a arsenito, regulación transcripcional, redundancia de genes.

B. ABSTRACT

Analysis of the arsenic resistance genes of *Burkholderia xenovorans* LB400

The pentavalent and trivalent inorganic species of Arsenic (As), As(V) and As(III), represent the most toxic compounds of As and the most abundant in the earth's crust. As(III) acts by forming covalent bonds with sulfhydryl groups of cysteine residues, affecting the structure and function of multiple proteins and enzymes; in addition, it can generate reactive oxygen species by binding to glutathione. On the other hand, As(V) owes its toxicity to its analogy with phosphate groups, therefore it interrupts its transport and assimilation and uncouples phosphorylation of ADP, which leads to an energetic impact. The main bacterial system of resistance to As lies in the reduction of As(V) to As(III) by the action of an arsenate reductase (ArsC) and the subsequent efflux of As(III) through membrane pumps (ArsB/Acr3). Several systems of resistance to As in prokaryotes have been described, not being the case for *Burkholderia xenovorans* LB400, a relatively large-genome bacterium (9.73 Mpb) isolated from a soil contaminated with polychlorinated biphenyls. LB400 has been studied by our working group due to its multiple chromate resistance genes (*chr*).

Previously, multiple sequences of probable *ars* genes were identified in the LB400 genome and its resistance to As was demonstrated, compared with standard strains. This suggested that the probable *ars* genes participate in resistance to the oxyanions of As. The objective of this work was to determine the role of the multiple *arsB* and *arsC* genes in resistance to As of LB400. Firstly, a phylogenetic analysis was carried out and were identified two probable As(III) transporters: Acr3 and ArsB, and four probable arsenate reductases ArsC1, ArsC2, ArsC3 and ArsC4. Acr3 and ArsC2 are encoded in the probable *arsRacrCH* operon. Subsequently, the *ars* genes were cloned and transferred to strains of *Escherichia coli* mutants in homologous *ars* genes and to *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. It was found that the *arsRacrCH* gene cluster and the *arsB* and *arsC4* genes conferred As resistance to the transformant strains. It was also found that resistance of LB400 to As is induced by both As oxyanions. Finally, it was found by RT-PCR that expression of the *arsR*, *arsC1* and *arsC4* genes was induced in the presence of As(III), whereas *arsC3* presented a basal expression in the presence and absence of the oxyanion. Expression of the *arsRacrCH* and *arsB* genes was not detected. These results indicate that the *acr3*, *arsB* and *arsC* genes present in the LB400 genome participate differentially in As resistance.

Key words: *ars* operon, arsenate resistance, arsenite resistance, transcriptional regulation, gene redundancy.

C. ÍNDICE

A. RESUMEN.....	I
B. ABSTRACT.....	II
C. ÍNDICE.....	III
D. ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
E. ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Arsénico.....	1
1.1 Generalidades del Arsénico.....	1
1.2 Distribución ambiental del Arsénico: Ciclo biogeoquímico.....	1
1.3 Mecanismos de toxicidad del Arsénico.....	3
1.4 Usos del Arsénico.....	5
2. Resistencia bacteriana a Arsénico.....	7
3. Operones <i>ars</i>	7
3.1 Evolución de los operones <i>ars</i>	12
3.2 Distribución y diversidad de operones <i>ars</i>	13
3.3 Redundancia de operones <i>ars</i>	15
3.4 Elementos del sistema bacteriano de resistencia a Arsénico.....	15
3.4.1 Bombas de expulsión de arsenito.....	15
3.4.2 Arsenato reductasas.....	18
4. <i>Burkholderia xenovorans</i>	19
4.1 <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	19
4.1.1 Genoma de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	19
4.1.2 Redundancia génica de <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400.....	20
II. ANTECEDENTES.....	23
III. JUSTIFICACIÓN.....	29
IV. HIPÓTESIS.....	29
V. OBJETIVO GENERAL.....	29
VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	30
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
1. Medios de cultivo.....	31
2. Cepas empleadas.....	31
3. Plásmidos empleados.....	31
4. Oligonucleótidos empleados.....	33
5. Análisis filogenético.....	33
6. Búsqueda de probables promotores.....	33
7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
8. Electroforesis en geles de agarosa.....	33
9. Purificación de DNA en geles de agarosa.....	38

10. Tratamientos enzimáticos.....	38
10.1 Ligación de los productos de PCR en el vector pJET 1.2/Blunt.....	38
10.2 Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pUCP20.....	38
10.3 Restricción con endonucleasas.....	38
11. Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	38
12. Secuenciación de DNA.....	39
13. Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	39
14. Preparación de células competentes de <i>P. aeruginosa</i> y mutantes de <i>E. coli</i>	39
15. Transformación por el método de electroporación.....	40
16. Pruebas de susceptibilidad en medio líquido.....	40
17. Cinéticas de crecimiento de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	40
18. Ensayos de inducción de la resistencia a Arsénico de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	40
19. RT-PCR.....	40
19.1 Aislamiento de RNA.....	40
19.2 Amplificación.....	41
IX. RESULTADOS.....	43
1. Análisis filogenético de los probables transportadores de arsenito y arsenato reductasas de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	43
1.1 Transportadores de arsenito.....	43
1.1.1 ArsB.....	43
1.1.2 Acr3.....	45
1.2 Arsenato reductasas.....	50
1.2.1 ArsC _{Grx/GSH}	50
1.2.2 ArsC _{Trx}	55
1.2.3 ArsC _{Grx/GSH} y ArsC _{Trx} de otras especies.....	55
2. Participación de los genes <i>arsB</i> y <i>arsC</i> de LB400 en la resistencia a arsenato y arsenito.....	60
2.1 Participación del operón <i>arsRacrCH</i> en la resistencia a As de LB400.....	67
2.1.1 Susceptibilidad a As de las transformantes con el operón <i>arsRacrCH</i>	67
2.2 Participación del gen <i>arsB</i> en la resistencia a As de LB400.....	71
2.2.1 Susceptibilidad a As de las transformantes con el gen <i>arsB</i>	71
2.3 Participación del gen <i>arsC₁</i> en la resistencia a As de LB400.....	75
2.3.1 Susceptibilidad a As de las transformantes con el gen <i>arsC₁</i>	75
2.4 Participación del gen <i>arsC₃</i> en la resistencia a As de LB400.....	81

2.4.1	Susceptibilidad a As de las transformantes con el gen <i>arsC₃</i>	81
2.5	Participación del gen <i>arsC₄</i> en la resistencia a As de LB400.....	81
2.5.1	Susceptibilidad a As de las transformantes con el gen <i>arsC₄</i>	81
3.	Expresión de los genes <i>arsB</i> y <i>arsC</i> de LB400 en ausencia y presencia de arsenito.....	88
3.1	Búsqueda de regiones promotoras del extremo 5´ de los genes <i>ars</i> de LB400.....	88
3.2	Análisis <i>in silico</i> del probable regulador ArsR.....	88
3.3	Inducción de la resistencia a As de LB400.....	96
3.4	Expresión de los genes <i>ars</i> de LB400.....	100
X.	RESUMEN DE RESULTADOS.....	108
XI.	DISCUSIÓN.....	109
XII.	CONCLUSIÓN.....	123
XIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	124

D. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo global del Arsénico.....	2
Figura 2.	Mecanismo de toxicidad del arsenito en bacterias.....	4
Figura 3.	Mecanismo de toxicidad del arsenato en bacterias.....	6
Figura 4.	Operón <i>ars</i> mínimo.....	8
Figura 5.	Regulación del operón <i>ars</i>	10
Figura 6.	Sistema bacteriano de resistencia a Arsénico.....	11
Figura 7.	Genoma de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	21
Figura 8.	Susceptibilidad a cromato de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	24
Figura 9.	Expresión relativa de los genes <i>chr</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400 durante la fase exponencial.....	25
Figura 10.	Susceptibilidad a cromato de las mutantes <i>chrA2::Gm</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	26
Figura 11.	Localización de genes <i>ars</i> en el genoma de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	27
Figura 12.	Susceptibilidad a As(III) y As(V) de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	28
Figura 13.	Mapa del vector pJET1.2/Blunt.....	32
Figura 14.	Mapa del vector de expresión binaria pUCP20.....	34
Figura 15.	Búsqueda de transportadores de As(III) ArsB de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	46
Figura 16.	Selección de transportadores de As(III) ArsB de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	47
Figura 17.	Búsqueda y selección de proteínas ArsB de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	48
Figura 18.	Relaciones filogenéticas de las proteínas ArsB de <i>B. xenovorans</i> LB400....	49
Figura 19.	Búsqueda de transportadores de As(III) Acr3 de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	51

Figura 20. Selección de proteínas Acr3 de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	52
Figura 21. Búsqueda de proteínas ArsC _{Grx/GSH} de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	53
Figura 22. Selección de proteínas ArsC _{Grx/GSH} de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	54
Figura 23. Búsqueda de proteínas ArsC _{Trx} de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	56
Figura 24. Selección de proteínas ArsC _{Trx} de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	57
Figura 25. Búsqueda y selección de proteínas ArsC _{Trx} de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	58
Figura 26. Relaciones filogenéticas de proteínas ArsC _{Trx} de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	59
Figura 27. Relaciones filogenéticas de proteínas ArsC de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	61
Figura 28. Búsqueda de proteínas ArsC de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	62
Figura 29. Susceptibilidad a Arsénico de las mutantes de <i>E. coli</i> interrumpidas en genes únicos.....	64
Figura 30. Susceptibilidad a Arsénico de la mutante <i>E. coli</i> AW3110.....	65
Figura 31. Caracterización del plásmido pUC_arsRacrCH en <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	68
Figura 32. Susceptibilidad a Arsénico de <i>E. coli</i> AW3110 (pUC_arsRacrCH).....	69
Figura 33. Susceptibilidad a As(V) de <i>E. coli</i> JW3470-1 (pUC_arsRacrCH) y <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pUC_arsRacrCH).....	70
Figura 34. Clonación de <i>arsB</i> en el vector pJET 1.2/Blunt.....	72
Figura 35. Subclonación de <i>arsB</i> en el vector pUCP20.....	73
Figura 36. Susceptibilidad a As(III) de <i>E. coli</i> AW3110 (pUC_arsB).....	74
Figura 37. Susceptibilidad a As(III) de <i>E. coli</i> JW3469-1 (pUC_arsB).....	76
Figura 38. Clonación de <i>arsC₁</i> en el vector pJET 1.2/Blunt.....	77
Figura 39. Subclonación de <i>arsC₁</i> en el vector pUCP20.....	78
Figura 40. Susceptibilidad a As(V) de <i>E. coli</i> AW3110 (pUC_arsC ₁).....	79
Figura 41. Susceptibilidad a As(V) de <i>E. coli</i> JW3470-1 (pUC_arsC ₁) y <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pUC_arsC ₁).....	80
Figura 42. Clonación de <i>arsC₃</i> en el vector pJET 1.2/Blunt.....	82
Figura 43. Subclonación de <i>arsC₃</i> en el vector pUCP20.....	83
Figura 44. Susceptibilidad a As(V) de <i>E. coli</i> AW3110 (pUC_arsC ₃).....	84
Figura 45. Susceptibilidad a As(V) de <i>E. coli</i> JW3470-1 (pUC_arsC ₃) y <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pUC_arsC ₃).....	85
Figura 46. Clonación de <i>arsC₄</i> en el vector pJET 1.2/Blunt.....	86
Figura 47. Subclonación de <i>arsC₄</i> en el vector pUCP20.....	87
Figura 48. Susceptibilidad a As(V) de <i>E. coli</i> AW3110 (pUC_arsC ₄).....	89
Figura 49. Susceptibilidad a As(V) de <i>E. coli</i> JW3470-1 (pUC_arsC ₄) y <i>P. aeruginosa</i> PAO1 (pUC_arsC ₄).....	90
Figura 50. Probable región promotora del operón <i>arsRacrCH</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	91
Figura 51. Probable región promotora del gen <i>arsB</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	92
Figura 52. Probable región promotora del gen <i>arsC₁</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	93

Figura 53. Probable región promotora del gen <i>arsC₃</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	94
Figura 54. Probable región promotora del gen <i>arsC₄</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	95
Figura 55. Alineamiento de la proteína ArsR del operón de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	97
Figura 56. Determinación de la concentración tóxica de As(V) y As(III) de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	98
Figura 57. Inducción de la resistencia a As de <i>B. xenovorans</i> LB400 con As(V).....	99
Figura 58. Inducción de la resistencia a As de <i>B. xenovorans</i> LB400 con As(III).....	101
Figura 59. Ensayo de expresión del gen <i>arsR</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	102
Figura 60. Ensayo de expresión del gen <i>arsC₁</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	104
Figura 61. Ensayo de expresión del gen <i>arsC₃</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	105
Figura 62. Ensayo de expresión del gen <i>arsC₄</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	106
Figura 63. Modelo hipotético del sistema de resistencia a As de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	122

E. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de operones <i>ars</i> presentes en microorganismos resistentes a Arsénico.....	14
Tabla 2. Transportadores de arsenito caracterizados.....	17
Tabla 3. Arsenato reductasas caracterizadas.....	17
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la clonación de genes.....	35
Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para RT-PCR.....	36
Tabla 6. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR.....	37
Tabla 7. Condiciones empleadas para los ensayos de RT-PCR.....	42
Tabla 8. Genes <i>arsB</i> y <i>arsC</i> de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	44
Tabla 9. Probables transportadores de As(III) y As(V) reductasas identificadas en el análisis filogenético de <i>B. xenovorans</i> LB400.....	63
Tabla 10. Fenotipos de cepas de <i>E. coli</i>	66

I. INTRODUCCIÓN

1. Arsénico

1.1 Generalidades del Arsénico

El Arsénico (As) es un elemento químico perteneciente al grupo de los metaloides, término que engloba a aquellos elementos que presentan propiedades físicas y químicas intermedias entre los metales y los no metales. Fue descubierto en el año 1250 por el sacerdote alemán Alberto Magno y desde entonces ha sido ampliamente utilizado a lo largo de la historia, principalmente como veneno (Rosen, 1999). El As tiene el número atómico 33 y presenta cuatro estados de oxidación: +5, +3, 0 y -3. En el ambiente se encuentra presente en diferentes formas químicas, orgánicas e inorgánicas (Bienert y col., 2007), predominando los estados de oxidación trivalentes y pentavalentes (Zhu y col., 2014), representados generalmente por los oxianiones arsenato [AsO_4^{-3} o As(V)] y arsenito [AsO_2^{-1} o As(III)], mientras que el As elemental y la arsina son las especies químicas menos abundantes (Oremland y col., 2009).

1.2 Distribución ambiental del Arsénico: Ciclo biogeoquímico

El As ocupa el lugar número 20 en abundancia en la corteza terrestre (Oremland y col., 2009), está ampliamente distribuido aunque en muy bajas concentraciones (Cervantes y col., 1994) y se presenta de manera no uniforme por toda la corteza dependiendo de la región geográfica, las características geoquímicas del suelo y la actividad industrial (Rangel y col., 2015). Los rangos de concentraciones en los que se encuentra presente son los siguientes: suelo, 0.1-1000 ppm; polvo atmosférico, 50-400 ppm; agua de mar, 2.6 ppb y agua dulce, 0.4 ppb (Mukhopadhyay y col., 2002).

La mayoría del As se encuentra presente en la litósfera y es liberado a los ambientes terrestres y del océano por actividades naturales como el desgaste de rocas, actividades geotermales y volcánicas o por actividades antropogénicas como la minería, la excavación de pozos y la fundición de metales (Zhu y col., 2014) (**Figura 1**). El As(V) es la forma predominante en ambientes oxigénicos, como en la superficie de agua y en suelos aeróbicos, mientras que el As(III) se vuelve la forma predominante en condiciones reductoras, como en suelos inundados o sedimentos anaeróbicos (Mishra y col., 2016).

Al ingresar a la biósfera, el As puede ser transferido a través de la cadena alimentaria, donde organismos superiores como plantas y animales acumulan compuestos de As a niveles por encima de los ambientes donde viven. Los microorganismos, principalmente las bacterias, llevan a cabo reacciones redox y la formación de enlaces covalentes con el carbono, siendo parte fundamental del geociclo del As (Mukhopadhyay y col., 2002) (**Figura 1**).

El As(V), principal componente de As en agua de mar, es tomado por organismos marinos, como fitoplancton, algas, crustáceos, moluscos y peces, convirtiéndolo en pequeños compuestos orgánicos (como ácido metilarsónico y ácido dimetilarsónico) y formas orgánicas de almacenamiento que incluyen arsenoazúcares solubles en agua (dimetilarseno-

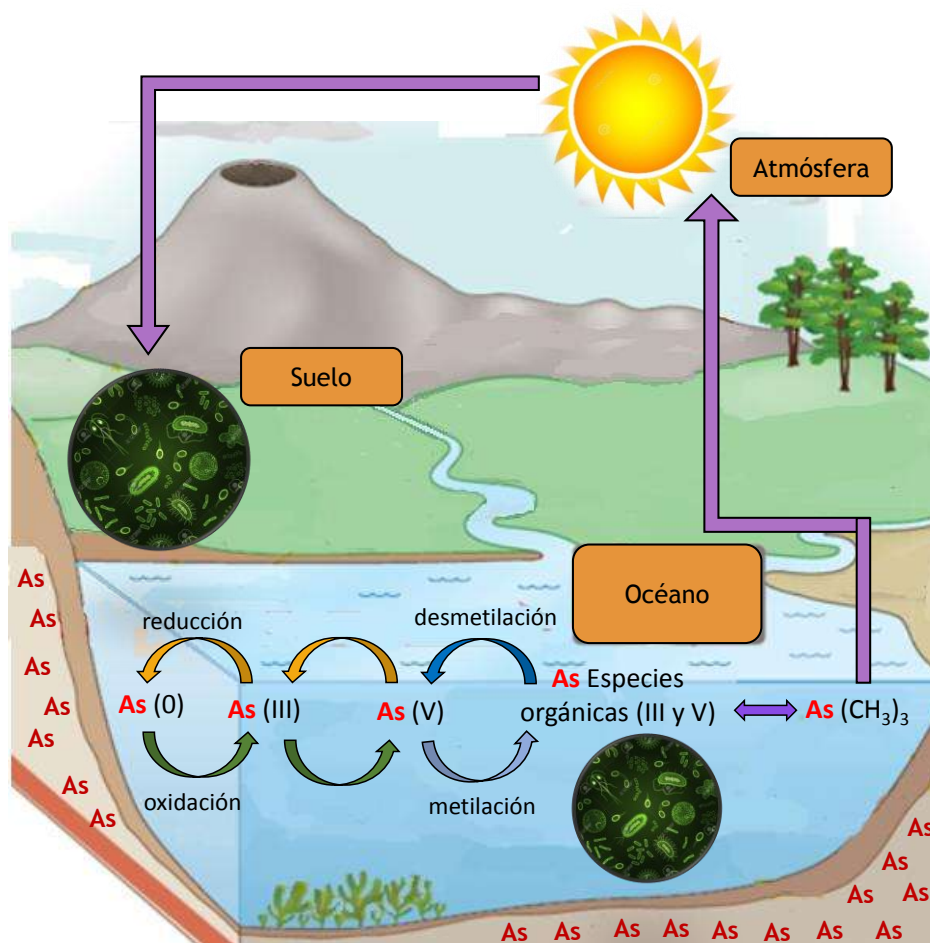


Figura 1. Ciclo global del Arsénico. El ciclo inicia con la liberación del As de la litósfera, lugar donde es más abundante, a la biósfera por actividades naturales y antropogénicas. Dentro de la biósfera, las interacciones con microorganismos generan las diferentes especies del metaloide. Sobresale la especie volátil trimetilarsina [As(CH₃)₃], compuesto que asciende a la atmósfera, donde por acción de los rayos ultravioleta (UV) se transforma en compuestos orgánicos no volátiles que posteriormente retornan a los suelos, donde dan lugar a especies de As inorgánicas mediante su interacción con los microorganismos, descrito con detalle en el texto, cerrando el ciclo del metaloide (Modificado de Zhu y col., 2014).

azúcares) y compuestos liposolubles (arsenolípidos); el principal organoarsenical aislado de organismos marinos es la arsenobetaína ($C_5H_{11}AsO_2$) (Mukhopadhyay y col., 2002) (**Figura 1**).

El As inorgánico, una vez metilado, genera compuestos orgánicos que eventualmente pasan a ser trivalentes y pentavalentes. De los distintos organoarsenicales que se generan se distingue a la trimetilarsina [$As(CH_3)_3$], especie volátil que asciende a la atmósfera donde es oxidada por acción de los rayos ultravioleta (UV), retornando a especies orgánicas no volátiles que posteriormente se depositan en la superficie de los suelos (Zhu y col., 2014), donde son degradadas por acción del metabolismo microbiano a ácido metilarsónico y a As inorgánico, completando el ciclo biológico del As (Mukhopadhyay y col., 2002) (**Figura 1**).

1.3 Mecanismos de toxicidad del Arsénico

El As es considerado el carcinógeno ambiental número 1 (Yang y Rosen, 2016). La toxicidad de los compuestos de As depende de su estado de oxidación, estado físico y la solubilidad en el medio biológico. Teniendo así que la escala de toxicidad decrece en el siguiente orden: arsina > As(III) > As(V) > organoarsenicales trivalentes > organoarsenicales pentavalentes > As elemental (Rangel y col., 2015). La interconversión de estos compuestos ocurre en la naturaleza con la participación de los microorganismos, promoviendo la movilización y biodisponibilidad del As en el ambiente (Zhu y col., 2014) (**Figura 1**). Los compuestos trivalentes orgánicos o inorgánicos son más tóxicos que los compuestos pentavalentes y son primeramente responsables de los efectos biológicos del metaloide (Mukhopadhyay y col., 2014).

El As (III) tiene la capacidad de ingresar a la célula a través de las acuagliceroporinas (AQPs) (Rosen y Liu, 2009), familia de proteínas que transportan moléculas de agua y solutos pequeños, como urea y glicerol (Mukhopadhyay y col., 2014); un ejemplo en bacterias es GlpF, AQP identificada en *Escherichia coli* (Sanders y col., 1997). El As(III) ingresa en su forma no ionizada, como hidróxido arsenioso [$As(OH)_3$], actuando como un imitador molecular inorgánico del glicerol (Mukhopadhyay y col., 2014). Dentro de la célula, el As(III) puede actuar como un metal, formando enlaces covalentes con los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteínas, afectando la estructura y función de numerosas proteínas y enzimas (Yang y col., 2012). Además, el As(III) puede generar especies reactivas de oxígeno (EROs) al unirse al glutatión, principal antioxidante celular, evitando la regulación del estado intracelular redox y generando a la célula un daño oxidativo (Mukhopadhyay y col., 2014) (**Figura 2**).

Por otra parte, el As(V) debe su toxicidad a su analogía con el grupo fosfato (Aguilar-Barajas y col., 2010), por lo cual tiene la capacidad de ingresar a la célula a través de los transportadores de fosfato; por ejemplo Pit (Transportador inespecífico de fosfato) y Pst (Transportador específico de fosfato) de *E. coli* (Rosen y Liu, 2009). Ambos compuestos presentan constantes de disociación (pKa) similares, As(V): 2.2, 7.0 y 11.5 y el fosfato; 2.1,

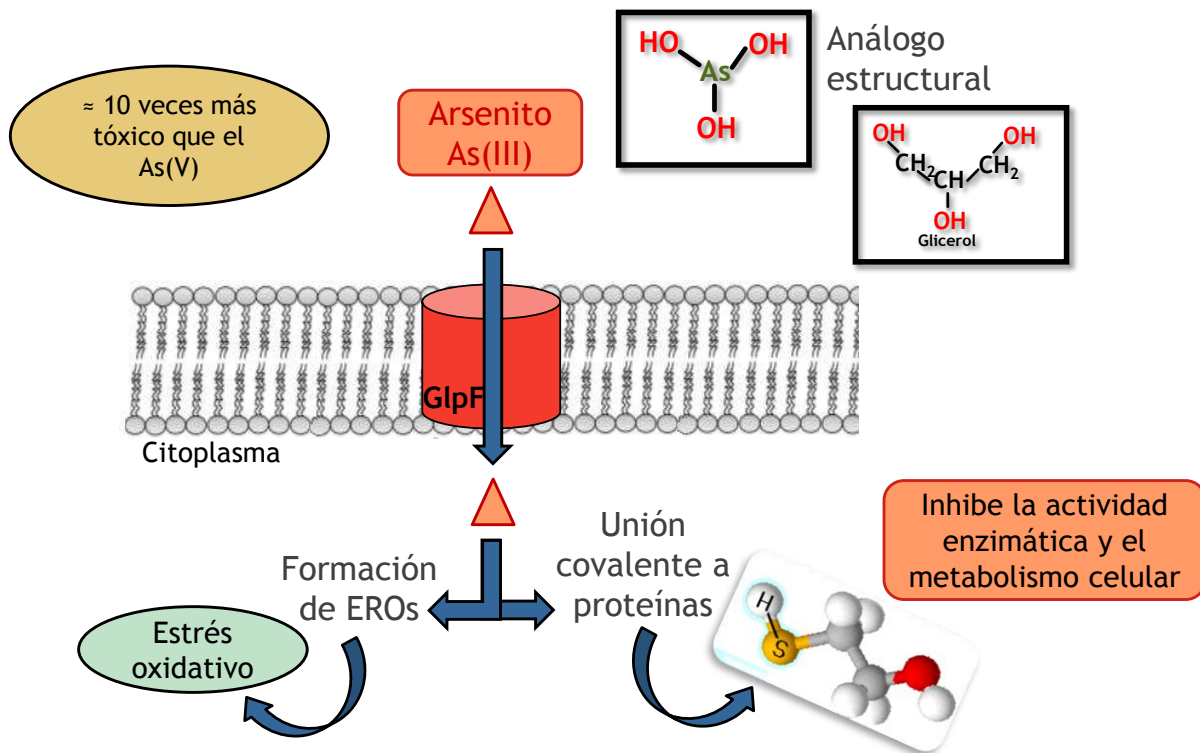


Figura 2. Mecanismo de toxicidad del arsenito en bacterias. El As(III) (triángulos rojos) ingresa a la célula como hidróxido arsenioso [As(OH)₃] a través de GpF (AQP), al tener una analogía estructural con el glicerol (C₃H₈O₃). En el citoplasma bacteriano, el As(III) puede unirse de forma covalente con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, inhibiendo la actividad enzimática y el metabolismo celular o puede dar lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), generando estrés oxidativo y por lo tanto daño celular (Modificado de Rosen y Liu, 2009).

7.2 y 12.7; esto indica que en cualquier ambiente existirán especies estructurales semejantes de As(V) y fosfato. Siendo así que el ingreso del As(V) a la célula dependerá de la concentración de fosfato en el medio debido a que ambos oxianiones compiten por el mismo sistema de transporte (Mukhopadhyay y col., 2002). Al comparar los parámetros cinéticos del transporte del As(V) y fosfato, ambos compuestos presentan una constante de Michaelis-Menten (K_m) de 0.4 mM, indicando que la afinidad del transportador por cada compuesto es similar; sin embargo, la diferencia radica en la velocidad máxima (V_{max}), donde el fosfato presenta un valor aproximadamente del doble comparado con el As(V), indicando que la tasa de transporte del fosfato es mayor comparada con el As(V) independientemente de la concentración de ambos compuestos en el medio (Rothstein y Donovan, 1963).

Retomando el mecanismo de toxicidad del As(V), una vez que éste logra ingresar a la célula, interrumpe la asimilación de fosfato (Bienert y col., 2007) y desacopla la fosforilación de ADP, lo que conlleva a un impacto energético y finalmente a un daño celular (Aguilar-Barajas y col., 2010) (**Figura 3**).

Al comparar el mecanismo de toxicidad de ambos compuestos, se señala al As(III) como el agente más tóxico, aproximadamente 10 veces, debido a que presenta una mayor facilidad de ingreso a la célula al no competir con ninguna otra molécula, situación que ocurre entre el As(V) y el fosfato; además, el As(III) presenta un blanco celular más accesible y esencial (proteínas y enzimas) (Chen y col., 2016) (**Figura 2**).

1.4 Usos del Arsénico

A lo largo de la historia el ser humano le ha dado al As una diversidad de usos en distintas áreas, generalmente como sales u óxidos. Se ha utilizado como veneno desde la Edad Media, principalmente entre las clases dominantes italianas, siendo conocido como “El veneno de reyes” y “el rey de los venenos” debido a la facilidad de pasar desapercibido en alimentos y bebidas y provocar la muerte de algunos reyes, como Luis XVI (Dilda y Hogg, 2007). En la industria se ha utilizado para la elaboración de semiconductores en unión con plomo y cobre (Mukhopadhyay y col., 2002) y en preservativos de madera, para evitar la putrefacción y el contacto con termitas, hormigas y otros insectos (Rosen y Liu, 2009). En la agricultura se han empleado organoarsenicales para el desarrollo de herbicidas y pesticidas; en la avicultura se utilizan organoarsenicales aromáticos pentavalentes, como roxarsona y ácido p-aminofenil arsónico como promotores de crecimiento y control de coccidiodomicosis (Yang y Rosen, 2016).

Por otra parte, el As se ha utilizado con fines terapéuticos desde hace más de 2,400 años (Klaassen, 1996). En la medicina tradicional China, el ácido arsenioso o trióxido de As se utilizó para el tratamiento de enfermedades como la psoriasis, la sífilis, las hemorroides y el reumatismo (Shen y col., 1997); en el siglo XVIII, Thomas Fowler desarrolló “La solución de Fowler”, basada en bicarbonato de potasio de trióxido de As, utilizada para tratar una serie de enfermedades, incluyendo leucemia, enfermedad de Hodgkin y anemia perniciosa, así

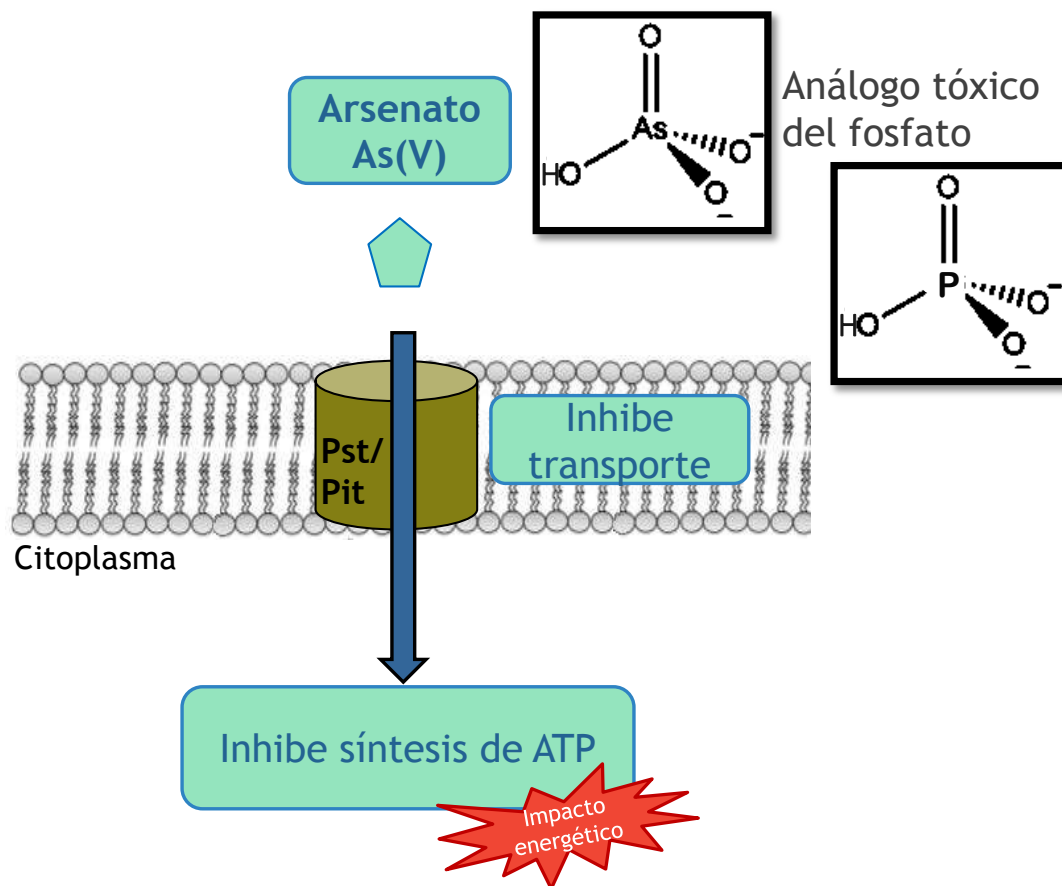


Figura 3. Mecanismo de toxicidad del arsenato en bacterias. El As(V) (pentágono azul) ingresa a la célula de forma ionizada $[\text{AsO}_4^{3-}]$ a través de los transportadores de fosfato Pst o Pit, debido a su analogía con el grupo fosfato. Además de que inhibe el transporte de fosfato, dentro de la célula interfiere en los mecanismo de síntesis de ATP, generando un impacto energético y por consecuencia un daño celular (Modificado de Rosen y Liu, 2009).

como otras afecciones como eccema, asma, pénfigo y psoriasis (Kwong y Todd, 1997). En 1998, Paul Ehrlich desarrolló al primer organoarsenical para uso terapéutico, el “Salvarsan” (Arsfenamina), utilizado para tratar la sífilis y la tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) (Lloyd y col., 2005). En 1949, se desarrolló el Melarsoprol, organoarsenical trivalente, para el tratamiento de la tripanosomiasis (Friedheim y Mel, 1949) y en 1971 los clínicos chinos probaron la eficacia de una solución intravenosa de trióxido de As al 1% que contenía cantidades traza de cloruro de mercurio para el tratamiento de diversos tipos de leucemia, logrando resultados en la leucemia promielocítica aguda (APL), un subtipo de leucemia mieloide aguda (LMA), y desde entonces a la fecha es utilizado como un agente anticanceroso en pacientes con APL (Dilda y Hogg, 2007).

2. Resistencia bacteriana a Arsénico

El As ha estado presente desde el origen de la tierra, hace aproximadamente 4.5 mil millones de años (Li y col., 2014), permaneciendo en el ecosistema en sus diferentes especies químicas según las condiciones ambientales (Line, 2002). Estudios sobre el origen de la tierra señalan que al inicio probablemente presentaba una atmósfera altamente reductora (Zahnle y col., 2010), ambiente que favoreció la presencia del As en su forma más reducida, As(III) (Mukhopadhyay y col., 2002). La presencia del As(III) sobre la corteza terrestre, desde el origen de la vida, hace aproximadamente 3.5 mil millones de años (Line, 2002), ejerció una presión selectiva sobre los organismos vivos, llevando a la selección de aquellos sistemas que pudieran sobrellevar el estrés generado por dicho agente tóxico. La relación contaminante-microorganismo probablemente originó una serie de procesos adaptativos que finalmente se expresaron como mecanismos genéticos de resistencia hacia el metaloide (González y col., 2013). Las bacterias resistentes a As son filogenéticamente diversas y están ampliamente distribuidas en los ambientes naturales sin importar el nivel de contaminación por As (Achour-Rokbani y col., 2007). Debido a lo mencionado anteriormente, Yang y Rosen, en el año 2016, resaltaron lo siguiente: “Sin los sistemas de detoxificación de As la vida sobre la tierra no podría haber existido”.

3. Operones *ars*

Los genes relacionados a As se encuentran presentes en cromosomas y plásmidos procarióticos, principalmente los genes denominados *ars*, que han sido identificados en todos los genomas de especies bacterianas secuenciados a la fecha (Yang y Rosen, 2016). Dichos genes generalmente se encuentran formando operones o grupos, aunque también se han identificado dispersos de forma individual en los genomas (Li y col., 2014).

Los operones *ars* presentan una gran diversidad estructural; sin embargo, generalmente mantienen algunos genes representativos, siendo éstos los constituyentes del denominado operón *ars* mínimo (Yang y Rosen, 2016), conformado por **(Figura 4)**:

- ❖ Gen *arsR*, que codifica ArsR, una proteína reguladora perteneciente a la superfamilia de proteínas metalorreguladoras SmtB/ArsR (Osman y Cavet, 2010).

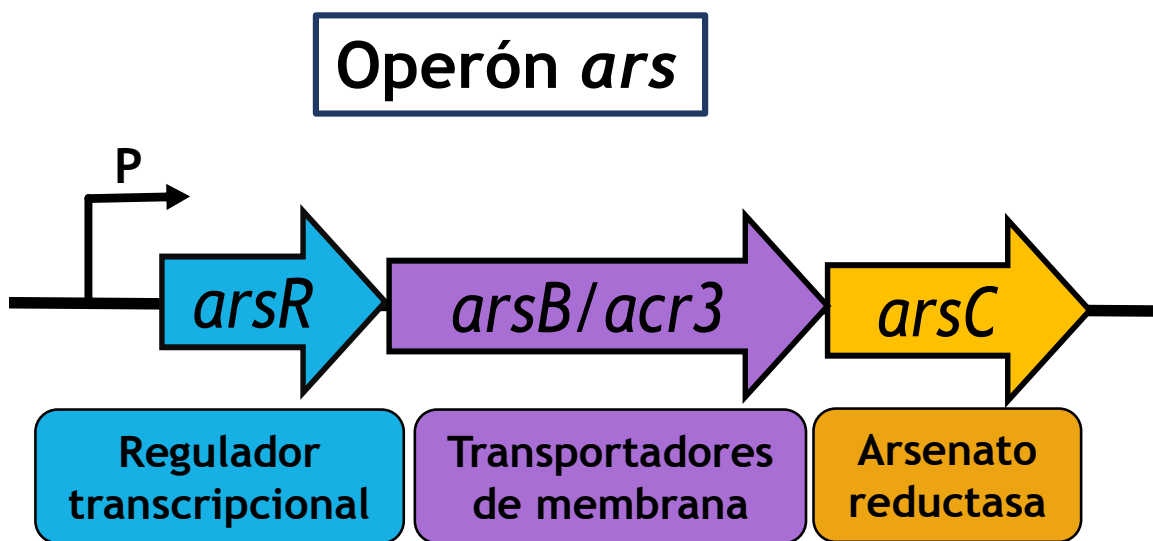


Figura 4. Operón *ars* mínimo. El operón *ars* mínimo representa al sistema más simple de resistencia a As(V) y As(III). Está constituido por tres genes, señalados en flechas de colores, que codifican un regulador transcripcional (ArsR), una bomba de expulsión de As(III) (ArsB o Acr3) y una arsenato reductasa (ArsC). Se indica el promotor (P) del operón en la región río arriba del extremo 5' de *arsR* (Modificado de Rosen, 1999b).

Funciona como represor, al impedir que la RNA polimerasa pueda realizar la transcripción de los genes adyacentes, actuando en forma *trans*, uniéndose al operador de los operones *ars* (Ji y Silver, 1992). La unión de ArsR con As(III) genera un cambio conformacional, el cual conduce a la disociación de la proteína de la región operadora del operón permitiendo así su transcripción (Rosen, 1999) (**Figura 5**).

- ❖ Genes *arsB* y *acr3*, que codifican ArsB y Acr3, respectivamente, proteínas de membrana capaces de expulsar As(III) del citoplasma celular, disminuyendo la acumulación intracelular del compuesto tóxico (Yang y col., 2012) (**Figura 6**).
- ❖ Gen *arsC*, que codifica ArsC, una arsenato reductasa que transforma el As(V) a As(III) para su posterior expulsión del citoplasma celular (Messens y col., 2002) (**Figura 6**).

La identificación del operón *ars* mínimo presenta una larga historia, iniciando en 1968, cuando Novick y Roth identifican una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a As; en ese tiempo, el estudio de genes de resistencia a antibióticos representaba una de las áreas de investigación de mayor demanda; sin embargo, después de esto surge una nueva línea de estudio dirigida a la resistencia bacteriana a As. Posteriormente, se identificó al elemento móvil que confería la resistencia al metaloide en *S. aureus*: el plásmido pI258 (Peyru y col., 1969), que años después fue secuenciado, identificando a los genes *arsR*, *arsB* y *arsC* (Ji y Silver, 1992), considerados hoy en día como los genes mínimos requeridos para conferir resistencia a especies de inorgánicas de As.

Actualmente, se han identificado genes *ars* adicionales a los del operón mínimo dando lugar a operones más complejos, ampliando el sistema de resistencia a As, mejorando al sistema codificado por el operón *ars* mínimo y/o confiriendo resistencia a especies orgánicas del metaloide. A continuación se indican los genes *ars* adicionales identificados a la fecha:

- Gen *arsA*, que codifica ArsA, una ATPasa citosólica (Rosen y col., 1990) que participa en la expulsión de As(III) al formar un complejo con ArsB (Yang y col., 2012) transformándolo en un sistema de transporte primario, dependiente de la hidrólisis de ATP (Rosen, 1999).
- Gen *arsD*, que codifica ArsD, una metalochaperona relacionada a As(III) que participa en la resistencia a As al aumentar la capacidad de ArsB de expulsar al compuesto tóxico (Lin y col., 2006).
- Gen *arsH*, que codifica ArsH, una metilarsenito oxidasa dependiente de NADPH que lleva a cabo la oxidación de metilarsenito a metilarsenato, confiriendo resistencia a compuestos orgánicos trivalentes (Ye y col., 2007).
- Gen *arsI*, que codifica ArsI, dioxigenasa dependiente de hierro con actividad de liasa que rompe enlaces Carbono-Arsénico, degradando metilarsenito a As(III), un compuesto más tóxico (Yoshinaga y Rosen, 2014).
- Gen *arsJ*, que codifica ArsJ, proteína de membrana perteneciente a la familia de

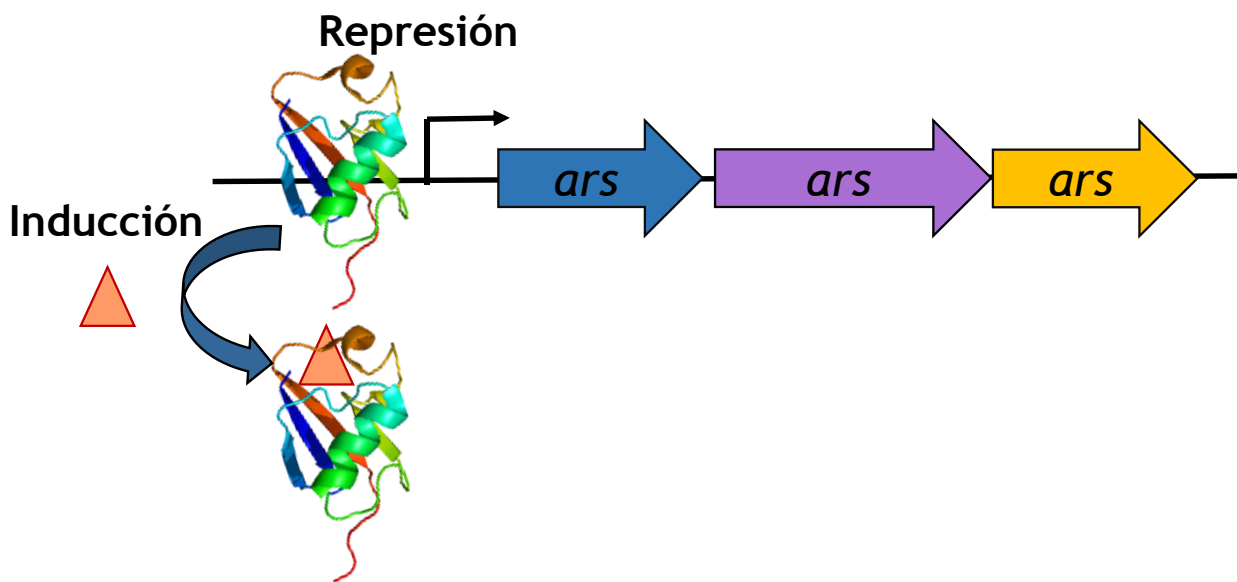


Figura 5. Regulación del operón *ars*. En el extremo 5' río arriba del operón *ars* se encuentra la región reguladora, donde se esquematiza a la proteína ArsR, la cual reprime la expresión de los genes al impedir la interacción con la RNA polimerasa. El As(III) (triángulo rojo) se une a la proteína represora ArsR, provocándole un cambio conformacional que resulta en la liberación de la región reguladora del operón, promoviendo así su transcripción (Li y col., 2014).

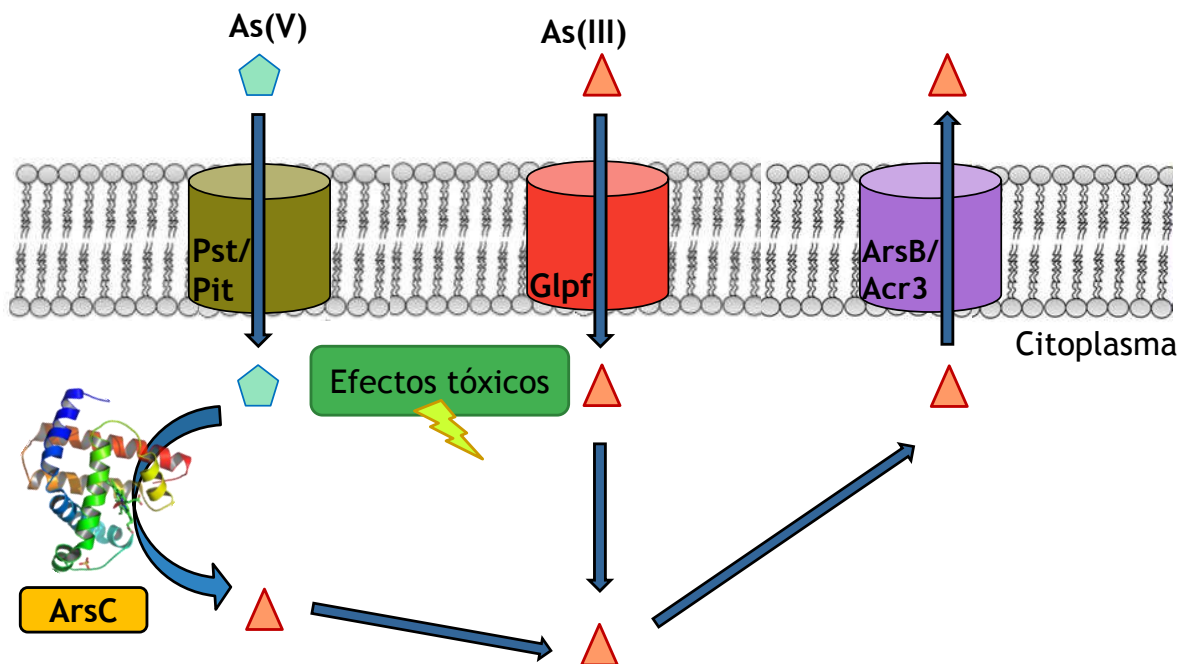


Figura 6. Sistema bacteriano de resistencia a Arsénico. El As(V) (pentágonos azules) ingresa a la célula a través de los transportadores de fosfato (Pst/Pit), mientras que el As(III) (triángulos rojos) lo hace a través de las acuagliceroporinas (Glpf). Dentro de la célula, ambos oxianiones pueden llevar a cabo sus efectos tóxicos. Por parte del sistema de resistencia, la arsenato reductasa (ArsC) reduce el As(V) a As(III) y las proteínas de membrana ArsB o Acr3 expulsan tanto el As(III) que ingresó a la célula a través de GlpF, como el generado por ArsC. Modificado de Serrato-Gamiño y Cervantes, 2017.

transportadores MFS, tiene la capacidad de expulsar 1-arseno-3-fosfoglicerato, compuesto donde el As participa con una valencia de +5, por lo cual confiere resistencia a As(V) (Chen y col., 2016).

- Gen *arsM*, que codifica ArsM, una S-adenosilmetionina metiltransferasa, la cual cataliza la metilación de As(III) generando compuestos orgánicos menos tóxicos y confiriendo resistencia a la principal especie inorgánica de As (Qin y col., 2005).

- Gen *arsP*, que codifica ArsP, proteína de membrana perteneciente a la familia Duf318, permite la expulsión de compuestos orgánicos pentavalentes de As, evitando los efectos tóxicos dentro de la célula (Shen y col., 2014).

A la fecha, existen genes también denominados *ars*, debido a que se identificaron en operones que albergan genes *ars* caracterizados y cuya eliminación afecta el fenotipo de resistencia a As; tal es el caso de los genes *arsO* y *arsT*, cuyos probables productos de traducción son: Monoxigenasa de unión a flavina y Tiorredoxina reductasa, respectivamente. Sin embargo, ninguno de estos determinantes se ha caracterizado (Wang y col., 2006).

3.1 Evolución de los operones *ars*

El sistema de resistencia a As radica principalmente en la expulsión del As(III) (**Figura 6**) (Li y col., 2014), siendo considerado un mecanismo ancestral para la destoxicación de As (Bienert y col., 2007). Por lo tanto, al tratar de dilucidar la evolución de los sistemas de resistencia al metaloide es fundamental tomar en cuenta las condiciones presentes en la tierra cuando se originó la vida. Considerando un ambiente altamente reductor y anaerobio, donde el As(III) sería la principal especie química de As (Mukhopadhyay y col., 2002), es lógico pensar que el determinante ancestral de la resistencia fue el gen *arsB*, ya que la estrategia más rápida y simple para evitar los efectos tóxicos del As(III) sería expulsarlo de la célula (Rosen, 1999). Debido a que todos los operones *ars* son controlados por un represor ArsR similar, se ha propuesto que la adición de un gen regulador ocurrió en una etapa temprana de la evolución del operón, conduciendo así al primer sistema de resistencia a As: el operón *arsRB* (Rosen, 1999), del cual existe un claro ejemplo en el genoma de *Bacillus subtilis* (Dubnau, 1993). Al paso de los años, conforme la atmósfera comenzó a oxidarse debido a la presencia del oxígeno generado por las cianobacterias (Mukhopadhyay y col., 2002), el As(III) empezó a ser transformado a As(V), especie que hoy en día predomina en condiciones aerobias. La aparición de una nueva especie de As, condujo al desarrollo de ArsC, proteína que transforma el As(V) a As(III), sustrato para el cual ya existía una bomba de expulsión (ArsB), concluyendo con el operón mínimo *arsRBC* (Rosen, 1999).

Los mecanismos de resistencia a As están presentes en todos los organismos analizados a la fecha, incluyendo plantas (Tripathi y col., 2014) y humanos (Drobna y col., 2010), apoyando la teoría de la fuerte presión selectiva ejercida por las condiciones ambientales primitivas (Yang y Rosen, 2016).

3.2 Distribución y diversidad de operones *ars*

Como se mencionó anteriormente, los genes microbianos de resistencia a As fueron identificados por primera vez en los llamados plásmidos R de aislados clínicos bacterianos, durante el análisis de genes de resistencia a antibióticos (Novick y Roth, 1968). Primeramente, se identificó el plásmido pI258 de la bacteria Gram-positiva *S. aureus* (Peyru y col., 1969), como elemento móvil que confería resistencia a las especies inorgánicas de As: As(V) y As(III). De igual manera, en una cepa de la bacteria Gram-negativa *E. coli*, aislada de una paciente con una infección del tracto urinario, se identificó un factor R que confería resistencia al metaloide (Hedges y Baumberg, 1973). Años después se determinó la secuencia de ambos elementos móviles, señalando la presencia de operones *ars*; en pI258 se presentó un operón conformado por los genes *arsRDABC* (Chen y col., 1986), mientras que en R773 se identificó al operón *arsRBC* (Ji y Silver, 1992) (**Tabla 1**).

Los plásmidos pI258 y R773 se consideran pioneros en la identificación de operones relacionados con la resistencia de As, por lo cual los genes que los conforman se utilizan como base de comparación en el análisis de probables genes de resistencia al metaloide (López-Maury y col., 2003).

Los operones modelo *arsRBC* y *arsRDABC* se han identificado en plásmidos de otros organismos; algunos ejemplos incluyen cepas de *E. coli*, de *Acidiphilium multivorans* AIU 301, aislada de agua mineral ácida, de *Yersinia sp.* y de *Sinorhizobium sp.* M14, aislada de sedimentos ricos en As en una mina de oro (**Tabla 1**). También, existen ejemplos de transposones que presentan variantes de los operones modelo; tal es el caso de las cepas JH642 de *B. subtilis*, *Acidithiobacillus caldus* y *Leptospirillum ferriphilum* (**Tabla 1**).

Actualmente se han identificado operones *ars* que difieren significativamente del operón mínimo *arsRBC*, en clase y número de genes, diferencias atribuidas a la transferencia horizontal de genes y/o rearrreglo genético ocurridos al paso de los años (Li y col., 2014).

Años después de la identificación de genes *ars* en los plásmidos R773 y pI258, la disponibilidad de secuencias de genomas completos de diversas especies procariotas, permitió identificar genes relacionados a As en cromosomas bacterianos; tal es el caso de cepas de *E. coli* (Diorio y col., 1995) y *Pseudomonas aeruginosa* (Cai y col., 1998), donde se identificó la presencia de operones *arsRBC* (**Tabla 1**), cuyos componentes resultaron ser genes homólogos a los presentes en R773 y pI258; en ambos casos, el operón *ars* se caracterizó funcionalmente.

Las variantes de los operones *ars* en cromosomas de especies bacterianas y arqueas son comunes; hoy en día es posible considerar que toda especie procariota posee al menos un sistema de resistencia a As (Li y col., 2014). Ejemplos de dichas variantes se han identificado en las bacterias *Thiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Pseudomonas fluorescens* MSP3, *Synechocystis sp.* PCC 6803, *Shewanella oneidensis* ANA-3 y *Campylobacter jejuni*, además de la arquea *Ferroplasma acidarmanus* (**Tabla 1**).

Tabla 1. Ejemplos de operones *ars* presentes en microorganismos resistentes a Arsénico.

Especie	Clasificación/Origen*	Genes <i>ars</i>	Replicón #	Referencia No.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Firmicutes/C	RBC	pI258	53
<i>Escherichia coli</i>	γ-proteobacteria/C	RDABC	R773	24
<i>Escherichia coli</i>	γ-proteobacteria/R	RBC	Crom	33
<i>Yersinia sp.</i>	γ-proteobacteria/A	HRBC	pYV	81
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	γ-proteobacteria/R	RBC	Crom	20
<i>Bacillus subtilis</i>	Firmicutes/R	RAcr3C	Tn (skin)	108
<i>Acidiphilium multivorum</i>	α-proteobacteria/A	RDABC	pKW301	114
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	γ-proteobacteria/A	BCHR	Crom	18
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	γ-proteobacteria/A	RBC	Crom	92
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	γ-proteobacteria/R	CRBH	Crom	19
<i>Serratia marcescens</i>	γ-proteobacteria/C	RBCH	R478	102
<i>Ferroplasma acidarmanus</i>	Arquea/A	RB--A	Crom	43
<i>Synechocystis sp.</i>	Cianobacteria/A	BHC---R	Crom	66
<i>Shewanella oneidensis</i>	γ-proteobacteria/A	DABC	Crom	105
<i>Halobacterium sp.</i>	Arquea/A	ADRC---MR ₂	pNRC100	120
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Actinobacteria/A	R ₁ B ₁ C ₁ ---R ₂ B ₂ C ₂	Crom	83
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	γ-proteobacteria/A	RCDADA---B	TnAtcArs	116
<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	β-proteobacteria/A	RCaBH--- RCaBCbH--- RCaAcr3CbH- RCaH	Crom	80
<i>Ochrobactrum tritici</i>	α-proteobacteria/A	RDAB--- R ₂ C ₂ Acr3H	Crom	14
<i>Campylobacter jejuni</i>	ε-proteobacteria/C	PRCAcr3	Crom	122
<i>Bacillus sp.</i>	Firmicutes/A	RBCDA--R2BC2	Crom	10
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	Firmicutes/A	R1B1C1--- R2B2C2--C3	Crom	27
<i>Sinorhizobium sp.</i>	α-proteobacteria/A	RC---RCaCbB--HR	pSinA	34
<i>Pseudomonas putida</i>	γ-proteobacteria/A	R1B1C1H1--- R2B2C2H2	Crom	86
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	α-proteobacteria/A	RCBH---RRCC-- RM	Crom	137
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	Nitrospira/A	URCB	Crom	54
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	γ-proteobacteria/A	CRBH	Crom	

*C, origen clínico; A, origen ambiental; R, cepa de referencia. # Crom, cromosoma; Tn, transposón. En el caso de genes plasmídicos, se da el nombre del plásmido (Tomada de Serrato-Gamiño y Cervantes, 2017).

3.3 Redundancia de operones *ars*

Además del operón *arsRBC* mínimo, en diversas especies microbianas se han identificado grupos más complejos de genes *ars* con una gran variedad de configuraciones génicas (**Tabla 1**). La presencia de múltiples genes *ars* redundantes parece ser frecuente, confiriendo diversos grados de resistencia a As (Li y Krumholz, 2007), y teniendo en claro que el número de operones *ars* no necesariamente presenta correlación directa con el nivel de resistencia al metaloide (Zhao y col., 2015); es probable que la presencia de genes *ars* redundantes se relacione con una expresión diferencial, dependiendo de las condiciones ambientales (Sánchez-Pérez y col., 2008).

La redundancia de genes *ars* se considera resultado de la duplicación de genes y/o transferencia horizontal (Li y col., 2014). A la fecha, se han identificado operones *ars* con una amplia gama de arreglos genéticos, existiendo cepas con variantes del operón *ars* mínimo repetidas, como *Bacillus* CDB3, *Geobacillus kaustophilus* A1 y *Pseudomonas putida* KT2440; genes *ars* distribuidos en el cromosoma principal y en plásmidos o transposones como es el caso de la arquea *Halobacterium* sp. y *L. ferriphilum*, respectivamente; además de la presencia de genes diferentes a los canónicos, como ocurre en *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Herminiimonas arsenicoxydans*, *Ochrobactrum tritici* SCII24 y *Rhodopseudomonas palustris* CG009 (**Tabla 1**). Las especies bacterianas con genes *ars* redundantes usualmente habitan ambientes complejos y perturbados por la contaminación de As (Serrato-Gamiño y Cervantes, 2017).

3.4 Elementos del sistema bacteriano de resistencia a Arsénico

Generalmente los sistemas bacterianos de resistencia, ante cualquier agente tóxico, consisten en una disminución de la concentración intracelular del compuesto nocivo, para lo cual han desarrollado diversas estrategias como: limitar su ingreso a la célula, promover su expulsión o transformar al agente tóxico en compuestos de menor toxicidad (Yang y col., 2015). Haciendo referencia al As, el mecanismo de resistencia consiste primeramente en la reducción del As(V) a As(III) por acción de una arsenato reductasa; la conversión de un compuesto tóxico a uno con mayor toxicidad radica en que el sistema de resistencia a As presenta una bomba de expulsión específica para As(III), que al participar de forma conjunta con la arsenato reductasa, confirieren resistencia a ambos oxianiones (Rosen, 1999) (**Figura 6**).

3.4.1 Bombas de expulsión de arsenito

El As(III) ha estado presente en la tierra desde el origen de la vida, favoreciendo la selección de sistemas de resistencia hacia dicho agente tóxico. Esto condujo al surgimiento de las bombas de expulsión de As(III), considerado el mecanismo bacteriano mayormente utilizado en la naturaleza (Rosen, 1999). Los transportadores de membrana de As(III) identificados a la fecha pertenecen a las familias ArsB, primeramente encontrados en el plásmido pI258 de *S. aureus* (Chen y col., 1986) y ArsY en el elemento SKIN de *B. subtilis* (Sato y Kobayashi,

1998). Debido a que ArsY es homólogo a ACR3, transportador de As(III) en *Saccharomyces cerevisiae*, este grupo de transportadores se han denominado Acr3 en bacterias (Bobrowicz y col., 1997) (**Tabla 1**).

A continuación se indican las características de cada transportador:

❖ ArsB

Proteína integral de membrana perteneciente a la superfamilia de transportadores de iones ArsB (Prakash y col., 2003); se han identificado en bacterias y arqueas (Fu y col., 2009) y sus características se resumen en la **Tabla 2**.

❖ Acr3

Proteína integral de membrana, miembro de la superfamilia de transportadores bilis/arsenito/riboflavina (BART) (Mansour y col., 2007); se han identificado en bacterias, arqueas y eucariontes (plantas, animales y hongos) (Achour y col., 2007; Fu y col., 2009). Presenta los extremos amino y carboxilo localizados en el área citosólica (Dey y Rosen, 1994); además de una Cys conservada en el motivo P/R-C-T/I-AMV localizada en el tercer segmento transmembranal (STM) (Aaltonen y Silow, 2008), cuya eliminación da lugar a la pérdida de función por lo cual se considera esencial en el mecanismo de transporte del As(III) (Fu y col., 2009). Se resumen sus características en la **Tabla 2**.

Ambas bombas de expulsión llevan a cabo un transporte activo secundario antiporte; utilizan la energía generada por el gradiente electroquímico de protones (H^+) para impulsar As(III) en su forma no ionizada, como $As(OH)_3$ (Rosen, 1999), en dirección contraria de dicho gradiente, expulsando al agente tóxico del citoplasma celular (Villadangos y col., 2012). Sin embargo, al acoplarse a ArsA, pueden formar un sistema de transporte primario de expulsión de As(III) dependiente de ATP, aumentando la eficiencia de las bombas de expulsión (Zheng y col., 2013).

A pesar del similar rol biológico de ArsB y Acr3, se considera que estos transportadores evolucionaron de forma independiente, al presentar un valor relativamente bajo de similitud (16%) en los análisis de secuencias (Bobrowicz y col., 1997), además, de las diferencias estructurales y de afinidad mencionadas anteriormente. Por estas razones, ArsB y Acr3 se han clasificado en familias de transportadores diferentes (Prakash y col., 2003; Mansour y col., 2007). Sin embargo, hoy en día algunos miembros de la familia Acr3 siguen señalados en la literatura como ArsB aún sin tener una similitud con dichos transportadores (Fu y col., 2009). Un estudio de los genomas bacterianos secuenciados a la fecha reveló una más amplia distribución de homólogos Acr3 en comparación con ArsB (Yang y col., 2015).

Aunque ArsB y Acr3 se han reconocido como los principales transportadores de As(III) predominantes, existen reportes de otros posibles transportadores bacterianos de As(III). Por ejemplo, Aqps, acuagliceroporina caracterizada como un transportador bidireccional de

Tabla 2. Transportadores de arsenito caracterizados.

Transportador	Origen	Tamaño (aa)*	No. de segmentos transmembranales	Especificidad	Identidad (%)
ArsB	<i>Escherichia coli</i> plásmido R773	429	12	As(III) y Sb(III)	57.5
	<i>Staphylococcus aureus</i> plásmido p1258				
Acr3	<i>Bacillus subtilis</i> Tn	404	10	As(III)	ArsB _{R773} : 26.7 ArsB _{p1258} : 27.8

Tabla 3. Arsenato reductasas caracterizadas.

Arsenato reductasa	Origen	Tamaño (aa)*	Cofactor	Sitios catalíticos
ArsC _{Trx}	<i>Staphylococcus aureus</i> (p1258)	131	Tiorredoxina	Cys 10, Cys 82 y Cys 89
ArsC _{Grx/GSH}	<i>Escherichia coli</i> (R773)	141	Glutarredoxina y Glutación	Cys 12

* aa, aminoácidos

As(III) en *Sinorhizobium meliloti*, confiere resistencia a As(V) y As(III) mediante la expulsión del As(III) (que ingresa directamente a la célula o el generado por ArsC) con ayuda de la energía generada por el gradiente provocado por la acumulación intracelular del As(III) (Yang y col., 2005) y ArsP, permeasa reportada como transportador de As orgánico trivalente, codificada en el operón *ars* de *C. jejuni*; confiere resistencia a compuestos organoarsenicales como roxarsona (Wang y col., 2009) (**Tabla 1**).

3.4.2 Arsenato reductasas

Como se mencionó anteriormente, durante el origen de la vida la tierra presentaba condiciones altamente reductoras; sin embargo, tras la aparición de las primeras cianobacterias se generó un aumento de oxígeno en la corteza terrestre, que provocó un cambio radical en el medio ambiente de la tierra transformando la atmósfera anteriormente reductora a oxidante; este fenómeno es mejor conocido como la Gran Oxidación (Mukhopadhyay y col., 2002). El ambiente oxidante presente en la tierra condujo a la oxidación de As(III), especie predominante de ambientes reductores, a As(V) y con ello a la evolución de proteínas capaces de reducir As(V) a As(III), para el cual ya existían las bombas de expulsión, ArsB y Acr3 (Mukhopadhyay y Rosen, 2002).

Las arsenato reductasas son pequeñas enzimas monoméricas que reducen el As(V) a As(III) a través de la oxidación y/o reducción de los grupos tiol presentes en sus cisteínas (Mukhopadhyay y col., 2002), reacciones acopladas a las enzimas Glutarredoxina o Tiorredoxina, que participan en el reciclaje de los grupos tiol de ArsC (Messens y Silver, 2006). Sin embargo, las ArsC pueden ser divididas en distintas familias, cuyas secuencias no están relacionadas y cuyos mecanismos difieren en los detalles catalíticos (Mukhopadhyay y col., 2002).

A la fecha se han identificado dos clases de arsenato reductasas: las ArsC relacionadas con Glutarredoxina/Glutatión (ArsC_{Grx/GSH}) y las ArsC relacionadas con Tiorredoxina (ArsC_{Trx}) (Messens y Silver, 2006).

❖ Familia ArsC_{Grx/GSH}

Primer grupo de ArsC identificado, presentan un tamaño de 141 aminoácidos (aa) y dos residuos de Cys conservados; sin embargo, sólo requieren el residuo Cys12 para llevar a cabo la reducción del As(V) (Martin y col., 2001). Requieren como cofactores Glutarredoxina (Grx), enzima capaz de reducir enlaces disulfuro intramoleculares y/o intermoleculares, y Glutatión reducido (GSH) (Messens y Silver, 2006). Estas enzimas no presentan actividad fosfatasa (Mukhopadhyay y col., 2002) y su pH óptimo es de 6.5 (Messens y col., 2002). La ArsC modelo de esta familia corresponde a la proteína caracterizada en el plásmido R773 de *E. coli* (Hedges y Baumberg, 1973).

❖ Familia ArsC_{Trx}

Grupo de enzimas con un tamaño de 131 aa, presentan tres residuos de Cys conservadas esenciales en la catálisis: Cys10, Cys82 y Cys89 (Zegers y col., 2001); requieren como cofactor Tiorredoxina (Trx), oxidorreductasa de enlaces disulfuro (Holmgren, 1995). Presentan como pH óptimo 8.0 (Messens y col., 2002). Poseen actividad de fosfatasa, aunque en un rango menor al de las fosfatasas de bajo peso molecular (PTPasa-LMW) además, de presentar un 26% de identidad al comparar ambas enzimas. La ArsC modelo de esta familia corresponde a la proteína caracterizada en el plásmido pI258 de *S. aureus* (Ji y Silver, 1992).

4. *Burkholderia xenovorans*

El género *Burkholderia* corresponde a un grupo de bacterias filogenéticamente bien definido y representa el grupo dominante de las β -proteobacterias (Kormas, 2011). Fue nombrado en honor al bacteriólogo norteamericano W. H. Burkholder, el primero en relacionar a las bacterias con enfermedades de las plantas (Burkholder, 1948). Alberga especies con una gran variedad de nichos ecológicos, oscilando del suelo a ambientes acuosos y asociadas con plantas, hongos, parásitos, animales, y humanos; las especies van de saprófitos a endosimbiontes y agentes de biocontrol a patógenos (Estrada-de los Santos y col., 2015).

Burkholderia xenovorans [del griego XENOS extranjero; VORANS devorar, digerir; XENOVORANS que digiere compuestos extraños (xenobióticos)]. Son bacilos de 1-2 μm de longitud y 0.5 μm de ancho, Gram-negativos, móviles, no esporulados, no fermentadores de glucosa y su temperatura óptima es 30°C (Goris y col., 2004).

Varias especies del género *Burkholderia* han ganado interés por su capacidad de degradar compuestos xenobióticos, como aromáticos halogenados; tal es el caso de *Burkholderia cepacia* CSV90, degradador de 2,4-diclorofenoxiacetato y 2-metil-4-clorofenoxiacetato (Bhat y col., 1994); *Burkholderia* spp. SJ98, degradador de 2-cloro-4-nitrofenol (Pandey y col., 2011), y *B. xenovorans* LB400, uno de los ejemplos mejor estudiados (Goris y col., 2004).

4.1 *Burkholderia xenovorans* LB400

B. xenovorans LB400 fue aislada de un suelo contaminado con bifenilos policlorados (PCB) en Moreau, Nueva York, EEUU por ingenieros de la compañía General Electric (Bedard y col., 1986). Es un degradador de PCB bien estudiado, representa el organismo modelo de la degradación de PCB y oxida más de 20 derivados de PCB, con un máximo de seis sustituciones en los anillos bifenilo. Tiene uno de los genomas más grandes dentro del género *Burkholderia* (Voronina y col., 2014), forma parte del grupo de Burkholderias no patógenas (Suárez-Moreno y col., 2008) y pertenece al clado de *Burkholderia graminis*, con miembros que comúnmente son encontrados en la rizósfera del césped (Chain y col., 2006).

4.1.1 Genoma de *Burkholderia xenovorans* LB400

Las especies de *Burkholderia* comúnmente poseen genomas grandes, compuestos por multirreplicones, cromosomas y plásmidos, confiriéndoles una elevada plasticidad genómica, lo cual explica la versatilidad del género (Lessie y col. 1996).

El genoma de LB400 tiene un tamaño de 9.73 megapares de bases (Mpb) y contiene aproximadamente 9,000 secuencias codificantes distribuidas en tres replicones circulares que han sido designados como: cromosoma 1 (4.90 Mpb), cromosoma 2 (3.36 Mpb) y megaplásmido (1.47 Mpb) (Chain y col. 2006) (**Figura 7**).

El cromosoma 1 contiene los genes principales del funcionamiento celular; por ejemplo, los partícipes en la replicación de DNA, división celular, metabolismo de nucleótidos y maquinaria de traducción, por lo que es considerado el cromosoma central de LB400. El cromosoma 2 fue denominado como cromosoma, y no como megaplásmido, debido a que presenta tres operones con genes ribosomales y varios genes para tRNAs, así como funciones celulares centrales involucradas en la replicación del DNA, un factor de elongación del DNA (polB) y metabolismo de aminoácidos. Además, el cromosoma 2 tiene funciones enfocadas al metabolismo energético, metabolismo secundario, transporte y metabolismo de iones inorgánicos, aminoácidos y carbohidratos, por lo cual se considera el determinante del estilo de vida de la cepa LB400 (Chain y col. 2006). Por último, el megaplásmido no participa en ninguna función esencial y está ausente en otras cepas de la misma especie; brinda funciones altamente especializadas, haciendo de LB400 una cepa con características específicas, como la reducción de nitrato y las vías de degradación de bifenilos y benzoato. Además, considerando que presenta un porcentaje de GC 1% menor a los dos cromosomas y un elevado número de secuencias de inserción, es considerado un mosaico de material genómico probablemente de origen foráneo (Chain y col. 2006) (**Figura 7**).

4.1.2 Redundancia génica de *Burkholderia xenovorans* LB400

El término de redundancia génica hace referencia a la presencia de dos o más genes dentro de un mismo genoma que codifican proteínas con funciones similares (Aslund y Beckwith, 1999). Las bacterias con genomas grandes comúnmente presentan redundancia génica (Denef y col., 2006), asegurando el mantenimiento de alguna función ante el fallo de un gen, debido a una mutación o desafío ambiental, compensando con la presencia de genes redundantes (Mendoza y col., 2011).

Basado en un análisis de secuencias, se determinó que LB400 presenta una redundancia génica de 17.6%, valor que corresponde a las 1,581 secuencias codificantes que presentaron mayor relación con secuencias propias de LB400 que con los 260 genomas completos utilizados en el análisis. Se concluyó así que, a la fecha, LB400 presentaba el mayor porcentaje de redundancia génica de bacterias de vida libre, donde el promedio es de 7.6% (Chain y col. 2006). La lista de parálogos consta de genes relacionados con transporte (230 parálogos), transducción de señales (164 parálogos), elementos móviles (112 parálogos), proteínas de membrana (66 parálogos) y metabolismo secundario (165 parálogos). Estos

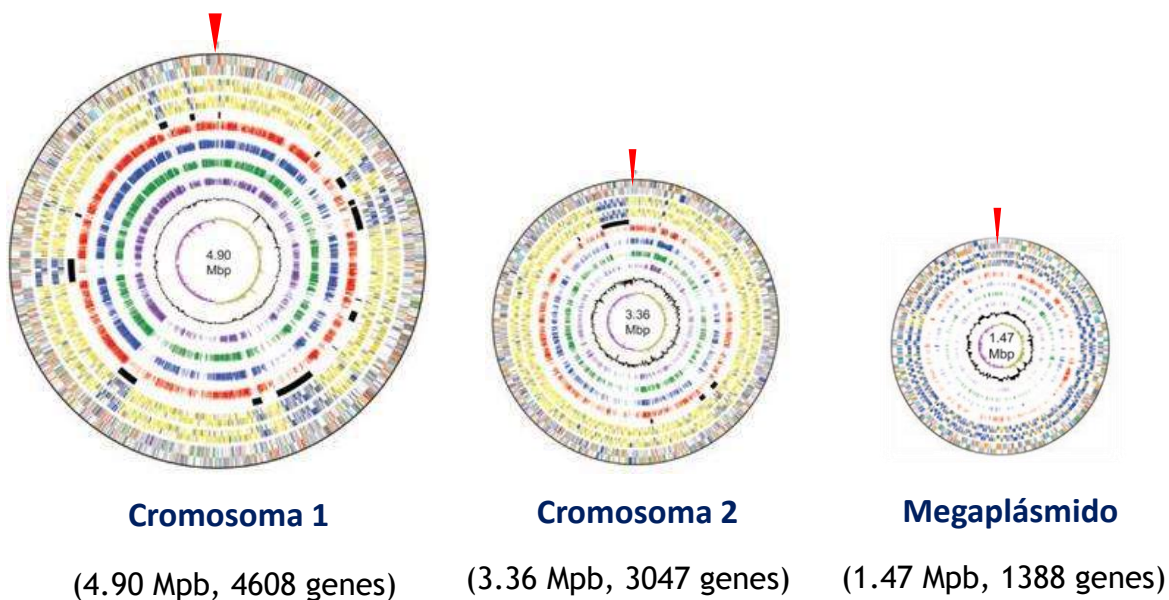


Figura 7. Genoma de *B. xenovorans* LB400. Se indica el esquema, tamaño y número de genes presentes en los tres replicones en los que se distribuye el genoma de *B. xenovorans* LB400. En líneas rojas se indica la localización del origen de replicación de cada replicón (Modificado de Chain y col., 2006).

1,581 parálogos se encuentran distribuidos numéricamente de manera más o menos uniforme entre los tres replicones (aproximadamente 500 genes por replicón). El elevado número de parálogos correspondientes a proteínas de transporte se correlaciona con la gran fracción de los genes de LB400 (aproximadamente 1,386 genes que codifican 610 sistemas de transporte) dedicados a esta función. El genoma de LB400 presenta más de 180 sistemas de expulsión, incluyendo 89 bombas de expulsión de drogas, 18 sistemas de secreción de proteínas, 21 bombas de expulsión de metales pesados y 18 bombas de expulsión de aminoácidos y de aminoácido-lactonas. Los 430 sistemas restantes están involucrados en el ingreso de compuestos orgánicos, cationes inorgánicos esenciales y varios aniones (Chain y col., 2006).

Otro de los grupos con mayor número de parálogos corresponde a las proteínas relacionadas con la transducción de señales. Se ha visto anteriormente que el número de redes de transducción de señales aumenta desproporcionadamente con el tamaño del genoma (Chain y col., 2006). LB400 dedica el 9% de su genoma a la transducción de señales, y utiliza casi todos los dominios sensores y reguladores encontrados en la transducción de señales en procariotas. Sin embargo, de forma dominante presenta proteínas de transducción de señales de un componente y un módulo regulatorio, de los cuales gran parte corresponden a sistemas citoplasmáticos solubles, lo que indica que detecta la mayoría de las señales ambientales intracelularmente, después de que han sido transportadas a la célula. Los sistemas de transducción de señales de dos componentes son menos abundantes (Chain y col. 2006). *B. xenovorans* LB400 presenta una extraordinaria capacidad de sensado comparada con otros microorganismos, tal es el caso de *Rhodococcus* sp., un microorganismo de nichos y genomas de tamaños similares a LB400, que posee 25% menos de sistemas de transporte y menos de la mitad de sistemas de transducción de señales (McLeod y col. 2006).

II. ANTECEDENTES

En el año 2007, Díaz-Pérez y col., realizaron un análisis filogenético de la superfamilia de transportadores de cromato CHR, estudio que resalta a las β -proteobacterias como el grupo taxonómico con mayor número de homólogos de CHR. Dentro de este grupo bacteriano sobresale *B. xenovorans* LB400, cuyo genoma posee seis homólogos CHR; cuatro homólogos de proteínas grandes (ChrA1a, ChrA1b, ChrA2 y ChrA6) y dos homólogos de proteínas pequeñas (ChrNCa y ChrNCb). En 2009, León-Márquez determinó que LB400 presenta un fenotipo de resistencia a cromato, al realizar ensayos de susceptibilidad a dicho agente y comparar con cepas de referencia (**Figura 8**). Estos resultados sugerían que el fenotipo de resistencia a cromato era debido a los homólogos CHR; para probar dicha hipótesis los genes fueron clonados y expresados en *E. coli*, donde todos los homólogos confirieron resistencia a cromato aunque de manera diferencial dependiendo de las condiciones de sulfato (análogo no tóxico de cromato) en el medio, sugiriendo que el sulfato podía regular la expresión de los genes *chr* en *E. coli*, y que esto también podría suceder en LB400. En 2014, Acosta-Navarrete y col., evaluaron la expresión de los genes homólogos *chr*, mediante RT-qPCR, partiendo de RNA total extraído de LB400, crecida en medio mínimo con diferentes concentraciones de sulfato y en presencia o ausencia de cromato; obteniendo que los genes *chr* presentan diferentes niveles de expresión entre sí pero que esto no está relacionado a la presencia de sulfato, concluyendo que el sulfato no regula la expresión de los genes *chr*. Por otra parte, se determinó que el gen *chrA2* perteneciente al operón *chrBACF*, localizado en el megaplásmido, fue el único gen inducido por cromato (**Figura 9**). Recientemente, Reyes-Gallegos y col., (2016) determinaron que los genes *chrA1b* y *chr1NCb*, del cromosoma 2, y *chrA2*, del megaplásmido de LB400, son los principales responsables del fenotipo de resistencia a cromato. Posteriormente, realizó la interrupción del gen *chrA2* con un cassette de resistencia a Gentamicina (Gm), generando las mutantes *chrA2::Gm-1* y *chrA2::Gm-2*, herramienta que permitió concluir que el gen *chrA2* del megaplásmido es el que confiere el mayor nivel de resistencia a cromato en LB400 (**Figura 10**).

Teniendo en cuenta que *B. xenovorans* LB400 fue aislada de un suelo contaminado con bifenilos policlorados y dados los resultados obtenidos en los trabajos mencionados anteriormente, donde se señala la resistencia de la cepa a cromato, es razonable considerar que LB400 probablemente cuenta con sistemas de resistencia a otros compuestos tóxicos, tales como As. En 2016, Reyes-Gallegos realizó una búsqueda preliminar para determinar la presencia de genes de resistencia a As en el genoma de LB400, logrando identificar un grupo de genes *ars* (8 *arsR*, 3 *arsB*, 2 *arsC* y 1 *arsH*), localizados en los cromosomas 1 y 2, los cuales probablemente confieren resistencia a dicho metaloide (**Figura 11**). La identificación de los genes *ars* en LB400 condujo a indagar sobre su participación en la resistencia a As. Salgado-Lora en 2017 determinó, mediante ensayos de susceptibilidad, que LB400 es resistente a As en comparación a una cepa estándar (**Figura 12**).

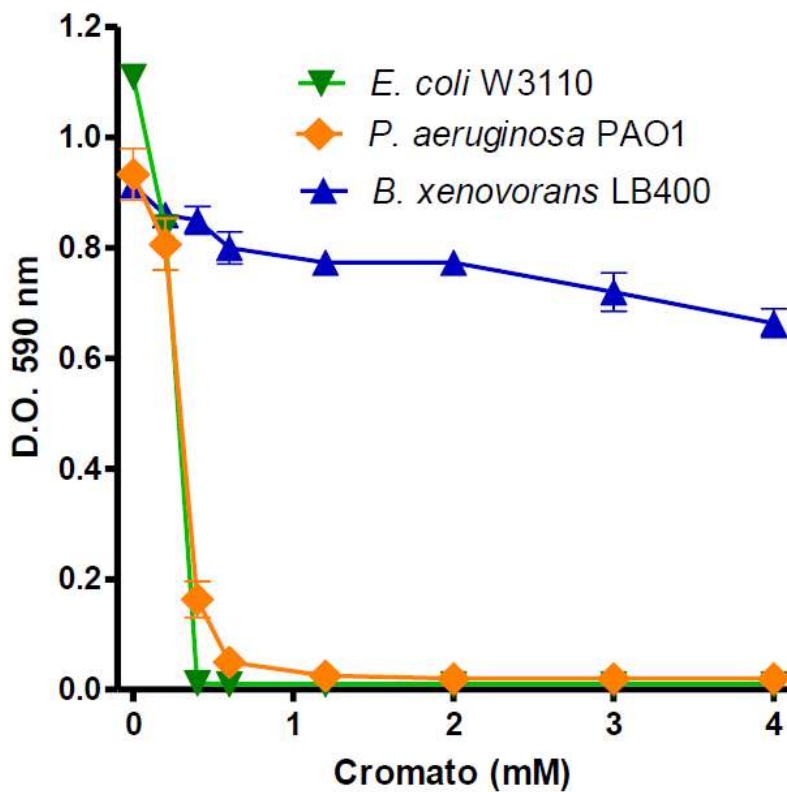


Figura 8. Susceptibilidad a cromato de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo por 24 h con agitación constante a 30°C, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. Se midió la absorbancia a 590 nm. Como cepas de referencia se utilizó *E. coli* W3110 y *P. aeruginosa* PAO1 (Tomado de León-Márquez, 2011).

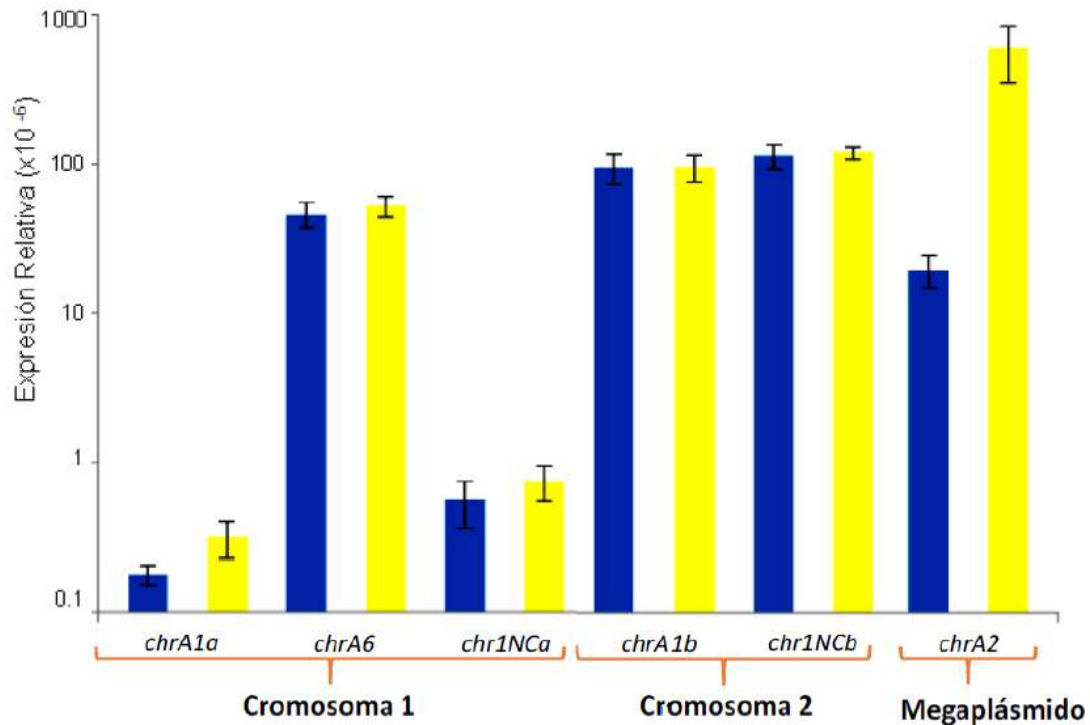


Figura 9. Expresión relativa de los genes *chr* de *B. xenovorans* LB400 durante la fase exponencial. Se crecieron los cultivos en medio K1m con 50 μM de sulfato, a una absorbancia de 0.6, en ausencia (barras azules) y presencia de 2 μM de cromato (barras amarillas). En el eje de las X se indican los genes *chr* y su localización dentro del genoma de *B. xenovorans*. La expresión del gen 16S RNAr se usó como normalizador (Modificado de Acosta-Navarrete y col., 2014).

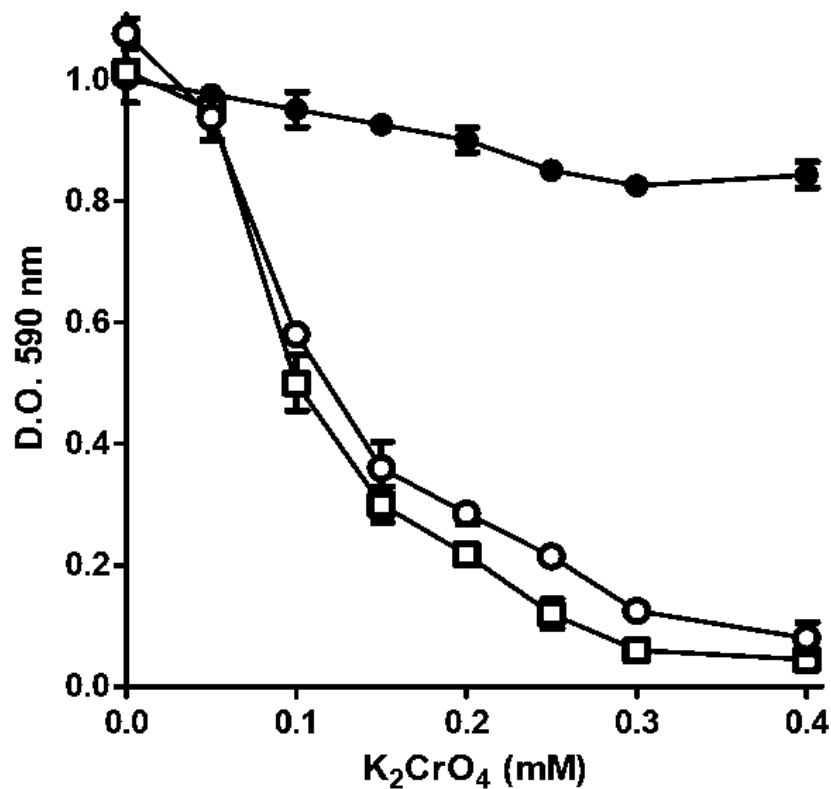


Figura 10. Susceptibilidad a cromato de las mutantes *chrA2::Gm* de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en medio K1m por 24 h a 30°C con agitación constante, utilizando las concentraciones de cromato indicadas. *B. xenovorans* LB400 (●), *chrA2::Gm-1*, (○), *chrA2::Gm-2* (□). n=6. (Tomado de Reyes-Gallegos, 2016).

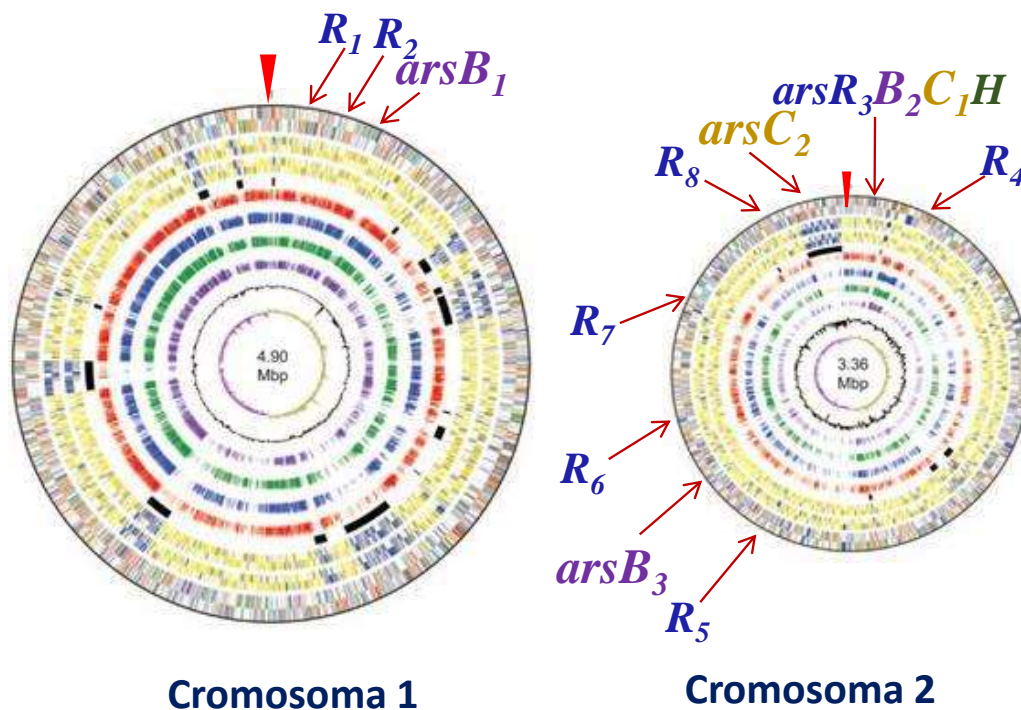


Figura 11. Localización de genes *ars* en el genoma de *B. xenovorans* LB400. Se indican los dos replicones en los que se localizaron genes *ars* en el genoma de *B. xenovorans* LB400. En flechas rojas se indica la localización de los genes *ars* identificados; 8 *arsR* (azul), que codifican probables reguladores transcripcionales, 3 *arsB* (morado), que codifican probables transportadores de arsenito, 3 *arsC* (amarillo), que codifican probables arsenato reductasas y 1 *arsH* (verde), que codifica una probable metil arsenito oxidasa (Modificado de Chain y col., 2006).

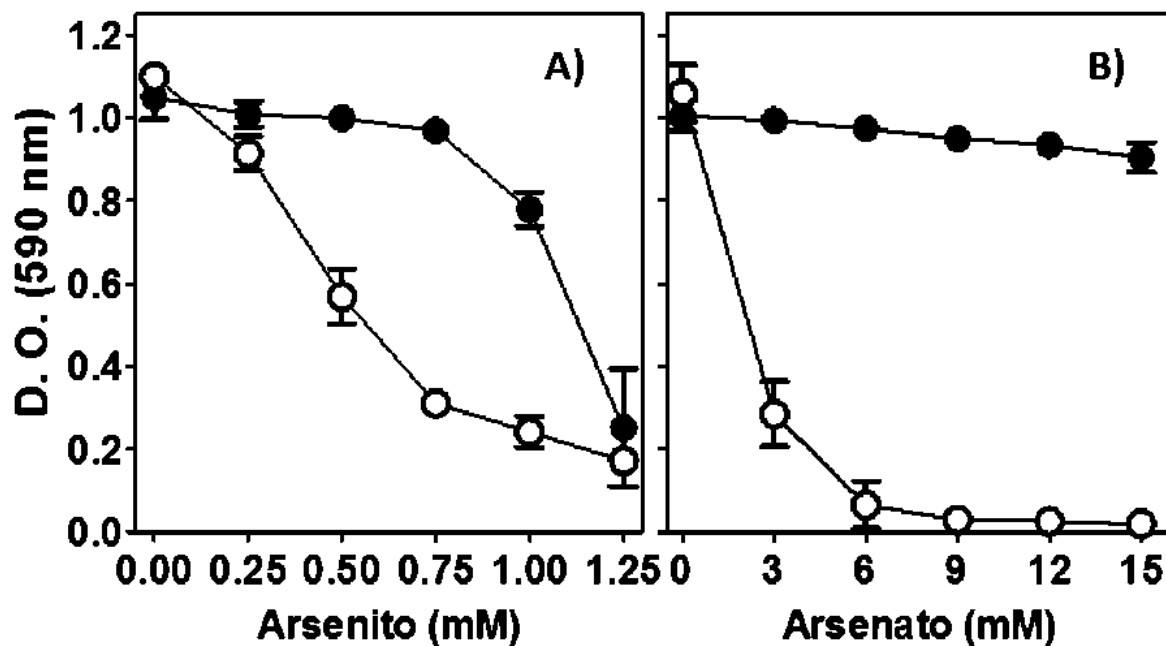


Figura 12. Susceptibilidad a As(III) y As(V) de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en Caldo Nutritivo por 24 h a 30°C y agitación constante a las concentraciones de As(III) y As(V) indicadas; después de ese tiempo se midió la absorbencia a 590 nm. Cepas utilizadas, *E. coli* JM101(○) empleada como control sensible y *B. xenovorans* LB400 (■). Se muestran las barras de error estándar de la media n=5 (Tomado de Salgado-Lora, 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

Burkholderia xenovorans LB400 posee un genoma relativamente grande que contiene numerosos genes adaptativos cuyos productos le permiten colonizar zonas contaminadas con hidrocarburos o con derivados tóxicos de elementos como cromo y arsénico. Previamente se encontró que LB400 presenta en su genoma múltiples genes *ars* probablemente relacionados con su resistencia a arsénico. Estos genes incluyen tres homólogos *arsB*, que codifican probables transportadores que expulsan arsenito, y dos homólogos *arsC*, que codifican probables arsenato reductasas que transforman arsenato en arsenito. El estudio de la función y la expresión de los múltiples genes *arsB* y *arsC* de LB400 es importante para entender las interacciones de este microorganismo con ambientes contaminados con derivados del arsénico.

IV. HIPÓTESIS

Los genes *arsB* y *arsC* presentes en el genoma de *Burkholderia xenovorans* LB400 participan de forma diferencial en la resistencia a iones de arsénico.

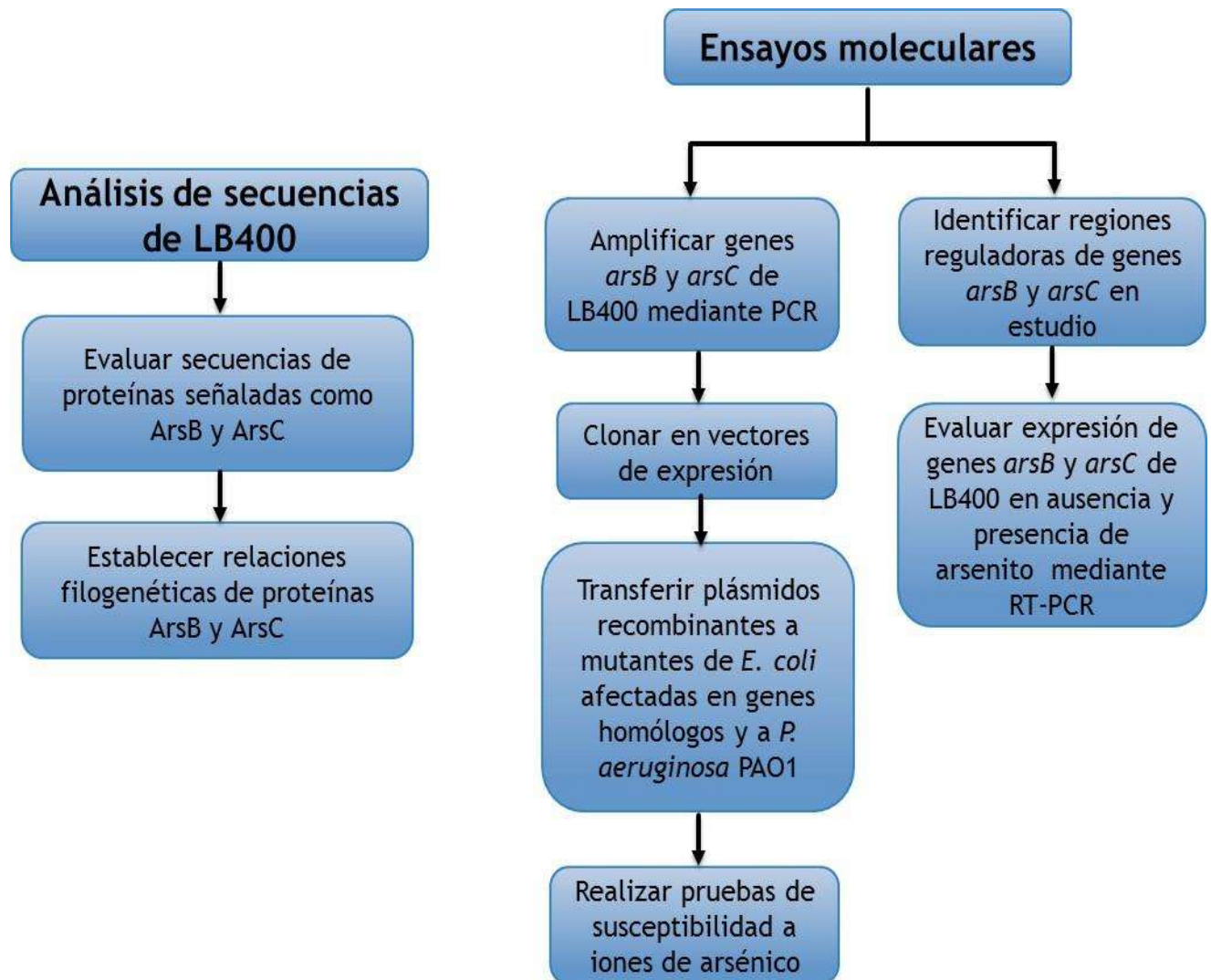
V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el funcionamiento de los múltiples genes *arsB* y *arsC* de *Burkholderia xenovorans* LB400 en la resistencia a iones de arsénico.

VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar un análisis *in silico* de los probables homólogos de las proteínas ArsB y ArsC presentes en el genoma de *B. xenovorans* LB400 y establecer relaciones filogenéticas de las proteínas ArsB y ArsC.
2. Establecer la participación de los genes *arsB* y *arsC* de *B. xenovorans* LB400 en la resistencia a arsenato y arsenito.
3. Evaluar la expresión de los genes *arsB* y *arsC* de *B. xenovorans* LB400 en ausencia y presencia de arsenito.

VII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron los siguientes:

- ❖ Caldo Luria Bertani (CL). Se preparó utilizando NaCl (J. T. Baker) 1%, peptona de caseína (Bioxon) 1% y extracto de levadura (Becton Dickinson) 0.5%.
- ❖ Caldo Nutritivo (CN). (Bioxon).
- ❖ Agar Nutritivo (AN). (Bioxon).
- ❖ Agar Luria Bertani (AL). Se preparó adicionando 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon) al CL.

2. Cepas empleadas

Las cepas empleadas fueron las siguientes:

- ❖ *B. xenovorans* LB400 (Goris y col., 2004). Cepa donada por el Dr. Jesús Caballero Mellado† del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM en Cuernavaca, Morelos.
- ❖ *E. coli* JM101 [F⁻, *traD36*, *proAB*, *lacI^qZΔM15*] (Yanisch-Perron y col., 1985). Cepa receptora de los plásmidos recombinantes derivados de los vectores pJET1.2/Blunt y pUCP20.

Las cepas utilizadas como receptoras de los plásmidos recombinantes derivados de pUCP20 y en pruebas de susceptibilidad fueron las siguientes:

- ❖ *E. coli* BW25113 [F⁻, Δ(*araD-araB*)567, *lacZ4787(del)::rrnB-3*, λ⁻, *rph-1*, Δ(*rhaD-rhaB*)568, *hsdR514*] (Grenier y col., 2014).
- ❖ *E. coli* W3110 [F⁻, *mcrA*, *mcrB* in (*rrnD-rrnE*)] (Hayashi y col. 2006).
- ❖ *P. aeruginosa* PAO1 (Holloway, 1969).

Las cepas mutantes utilizadas en pruebas de susceptibilidad a As debido a su fenotipo fueron las siguientes:

- ❖ *E. coli* AW3110. Cepa mutante de W3110, presenta el operón *ars* sustituido por un cassette de resistencia a cloranfenicol (Cm). As^S (Carlin y col., 1995).
- ❖ *E. coli* JW3469-1. Cepa mutante de BW25113, presenta el gen *arsB* interrumpido por un cassette de resistencia a kanamicina (Km) (Genetic Stock Center, Yale University).
- ❖ *E. coli* JW3470-1. Cepa mutante de BW25113, presenta el gen *arsC* interrumpido por un cassette de resistencia a Km (Genetic Stock Center, Yale University).

3. Plásmidos empleados

Los plásmidos utilizados fueron los siguientes:

- ❖ pJET 1.2/Blunt. Vector que se utilizó para la recuperación de productos de PCR (**Figura 13**).

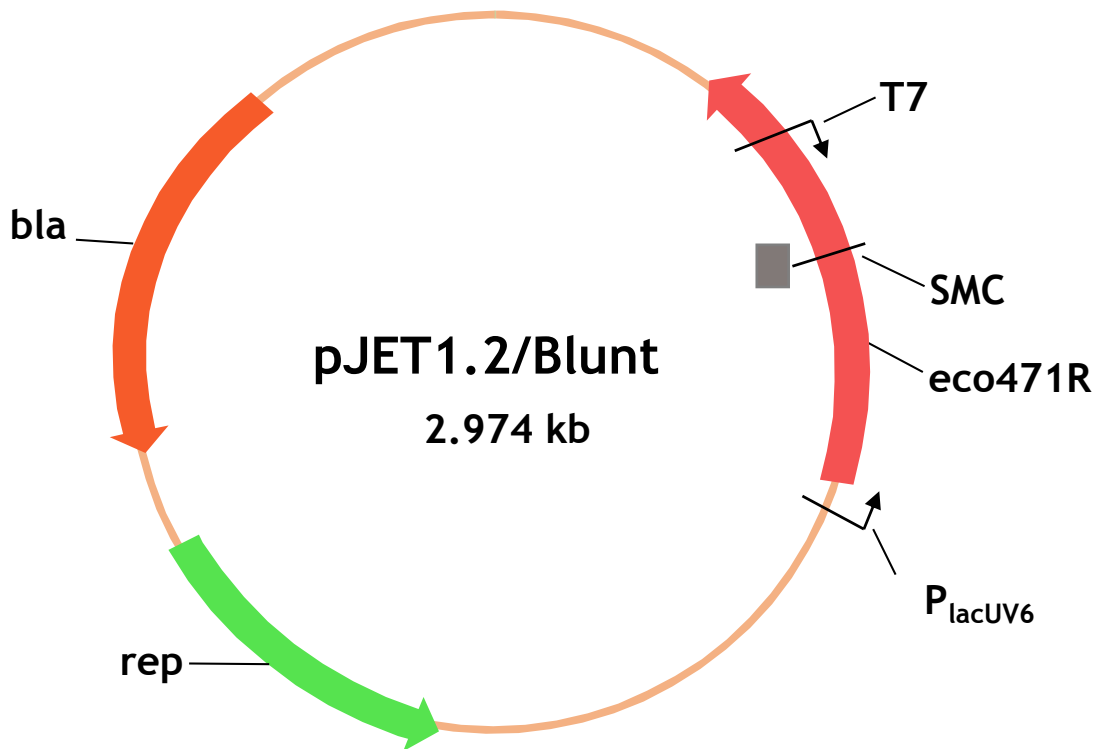


Figura 13. Mapa del vector pJET 1.2/Blunt. El vector contiene el gen *bla* de resistencia a ampicilina, un origen de replicación para *E. coli* rep (pMB1); el gen letal *eco471R* que permite la selección positiva de las transformantes con el inserto en el vector; el promotor T7 para la transcripción *in vitro* del inserto; el promotor PlacUV5 para la expresión del gen *eco471R* a un nivel suficiente para permitir la selección positiva y un sitio múltiple de clonación (SMC) (Fermentas).

- ❖ pUCP20. Vector de expresión binaria que se utilizó para la expresión de los genes de interés (**Figura 14**).

4. Oligonucleótidos empleados

Para el diseño se utilizó el programa OligoAnalyzer 3.1. Se diseñaron parejas de oligonucleótidos específicos para la amplificación y clonación de los genes (**Tabla 4**), además de oligonucleótidos para RT-PCR que permiten amplificar regiones intergénicas del operón *ars* y regiones internas de los genes individuales en análisis (**Tabla 5**).

5. Análisis filogenético

Para el análisis se utilizó la información de la base de datos del genoma de LB400 [Burkholderia Genome DB (<http://www.burkholderia.com/>)] y se analizó en los programas: Blastp (NCBI), donde se realizó la depuración de datos; Clustal W, para el alineamiento múltiple de secuencias; MEGA, donde se elaboraron árboles filogenéticos mediante los métodos Neighbor Joining y Mínima Evolución con Boostrap 1000, y HMMER, utilizado para determinar la presencia de dominios conservados (HMMER).

6. Búsqueda de probables promotores

Para realizar la búsqueda de probables promotores se ingresó la secuencia río arriba del codón de inicio (50 nucleótidos) de los genes en análisis al programa Softberry, Inc. (<http://www.softberry.com/>), el cual arrojó la posible relación con los promotores correspondientes a los factores Sigma (σ) de *E. coli*, eligiendo para cada caso el de mayor similitud. Además, la búsqueda de probables promotores también se realizó mediante un análisis visual.

7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El procedimiento de amplificación de los genes de interés, mediante la reacción en cadena de la polimerasa, se llevó a cabo utilizando DNA a una concentración aproximada de 200 ng/ml, 10 picomoles de los oligonucleótidos específicos, 5 μ l de la mezcla de reacción Master Mix (Promega) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, $MgCl_2$ y dNTPs a concentraciones optimizadas en un volumen final de 10 μ l. Para la amplificación de los diferentes genes se siguieron las especificaciones indicadas en la **Tabla 6**.

8. Electroforesis en geles de agarosa

La separación de los productos de PCR y del DNA plasmídico se realizó en geles de agarosa (Sigma) a una concentración de 1% (p/v); se empleó como amortiguador TAE [Tris-acetato 0.04 M (pH 7.5) y EDTA (Ácido etilendiamino tetracético) 0.5 M (pH 8.0)]. Los geles se depositaron en una cámara de electroforesis horizontal, conteniendo TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga [azul de bromofenol 0.05%, EDTA 0.1 M (pH 8.0),

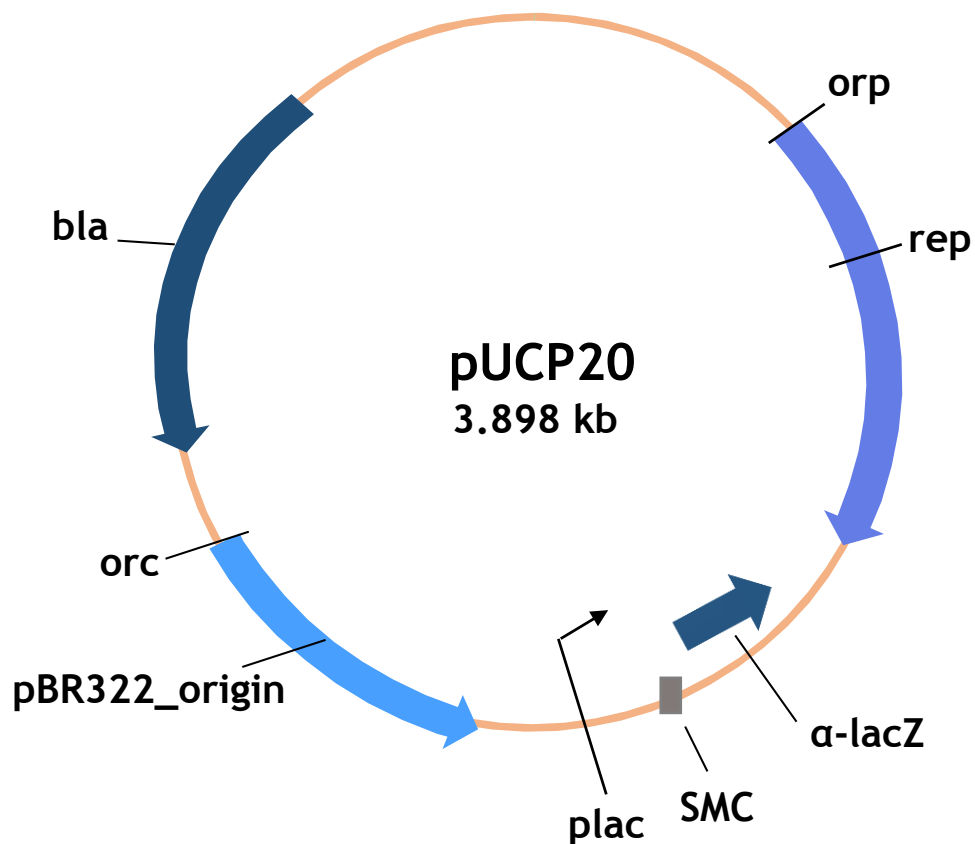


Figura 14. Mapa del vector de expresión binaria pUCP20. El vector contiene el gen *bla* que confiere resistencia a ampicilina y carbenicilina; orígenes de replicación para *E. coli* (*orc*) proveniente del plásmido pBR322 y *P. aeruginosa* (*orp*); el gen *rep*, que codifica una proteína implicada en la replicación en *Pseudomonas*; *α-lacZ*, parte del gen que codifica la región amino terminal de la β-galactosidasa; el promotor *plac* y un sitio múltiple de clonación (SMC) (West y col., 1994).

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la clonación de genes*.

Operón/ORF	Genes	Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Sitio de restricción	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
<i>arsR3acr3C2H</i>	Operón <i>ars</i>	Ars3-D	GAT GCT <u>GGA TCC</u> TTA TCA GCA GAC	<i>Bam</i> HI	2950
		Ars4-R	GAG ATC <u>CAA GCT TGT</u> AAG CTC GAC	<i>Hind</i> III	
<i>Bxe_A1669</i>	<i>arsC1</i>	Bxe_A1669-D	GCA GAT <u>CGG ATC CAA</u> CGT TCA C	<i>Bam</i> HI	930
		Bxe_A1669-R	GCC GGC AAA <u>AGC TTT</u> TTG AGT C	<i>Hind</i> III	
<i>Bxe_B1017</i>	<i>arsC3</i>	Bxe_B1017-D2	CGA GAC <u>GGA TCC</u> TTC TGT CTG	<i>Bam</i> HI	997
		Bxe_B1017-R2	GCA GGT CAG <u>TCT AGA</u> GAC CAC	<i>Xba</i> I	
<i>Bxe_B2062</i>	<i>arsB</i>	ArsBb_D	CGC TGA TCT <u>AGA CGA</u> ACA CC	<i>Xba</i> I	1878
		ArsBb_R	CCA GCA AGC <u>TTC ACA</u> TTC CG	<i>Hind</i> III	
<i>Bxe_B3030</i>	<i>arsC4</i>	ArsC2b_D	CTC CCC AAC <u>CTC TAG</u> AAT CC	<i>Xba</i> I	631
		ArsC2b_R	CGG AAC AAA <u>AGC TTA</u> TCG CC	<i>Hind</i> III	

* Se indica el nombre del operón y de los genes *ars*, teniendo en cuenta el código correspondiente en la base de datos del genoma de LB400, el nombre de los oligonucleótidos, indicando su sentido directo (D) y reverso (R) y en la secuencia se subraya el sitio de corte adicionado de la enzima de restricción .

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para RT-PCR *.

Operón/ORF	Denominación	Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Tamaño del fragmento amplificado (pb)
<i>arsR3acr3C2H</i>	<i>arsR-acr3</i>	<i>arsRA3_D</i>	CCA CCT GAG AGC TCT TTC AC	440
		<i>arsRA3_R</i>	GAT TGA CGG ATC CCA CTT CC	
	<i>acr3-arsC</i>	<i>A3C_D</i>	CAC GGC AAT GAA TTC GTT CG	383
		<i>A3C_R</i>	CTC AAG GAC GTC TAG ATC AGA C	
	<i>arsC-arsH</i>	<i>arsCH_D</i>	CAT CCG GAG CTC ATT AAC CG	435
		<i>arsCH_R</i>	GCT TAC GAA GCT TGA CCA CC	
<i>Bxe_A1669</i>	<i>arsC1RT</i>	<i>Bxe_A1669-RTD</i>	CGT CTA CGG CAT TCC GAA CTG	313
		<i>Bxe_A1669-RTR</i>	GGA AAA GCC GAG CGA CTT GAC	
<i>Bxe_B0304</i>	<i>arsR3</i>	<i>RTarsR3_D</i>	GAT GGT ATG ACT GAC GGT GAG ATC	181
		<i>RTarsR3_R</i>	CAG TTC TCT GTG AGG AGA CTG ATC	
<i>Bxe_B1017</i>	<i>arsC3RT</i>	<i>Bxe_B1017-RTD</i>	GGT TCA TCC ATT TGC GGT CGC	296
		<i>Bxe_B1017-RTR</i>	GCA GTT CGA TAA ACG CGC TGA C	
<i>Bxe_B2062</i>	<i>arsB2RT</i>	<i>ArsB-RT_D</i>	CAG AAA GGC GAA GAC GGA TC	611
		<i>ArsB-RT_R</i>	GGT TGT TCA TCA GAT TGC TGC C	
<i>Bxe_B3030</i>	<i>arsC4RT</i>	<i>ArsC2-RT_D</i>	CGA CAC CTA CAA CAG CGC AAA C	215
		<i>ArsC2-RT_R</i>	GGA TGG GAT GTT TCG CCA ATG C	

* Se indica el nombre del operón y de los genes *ars*, la denominación asignada para cada fragmento amplificado y el nombre de los oligonucleótidos, indicando su sentido directo (D) o reverso (R).

Tabla 6. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR*.

Gen	Denominación	Desnaturalización inicial °T/Tiempo	Amplificación (30 ciclos)			Extensión final °T/Tiempo
			Desnaturalización °T/Tiempo	Alineamiento °T/Tiempo	Extensión °T/Tiempo	
<i>Bxe_A1669</i>	<i>arsC1</i>	95° C/5 min	95° C/30 seg	57.7° C/30 seg	72° C/2 min	72° C/5 min
<i>Bxe_B1017</i>	<i>arsC3</i>			54.6° C/30 seg	72° C/45 seg	
<i>Bxe_B2062</i>	<i>arsB</i>			52° C/30 seg	72° C/2 min	
<i>Bxe_B3030</i>	<i>arsC4</i>			56° C/30 seg	72° C/1:30 min	

* Se indica el nombre de los genes *ars*, la denominación asignada para cada fragmento amplificado y las condiciones utilizadas en los ensayos de PCR.

SDS (dodecil sulfato de sodio) 5% y sacarosa 40%] y se colocaron en los orificios del gel. El corrimiento electroforético se realizó a un voltaje constante de 125 voltios por un periodo de 30-40 min. Posteriormente las bandas teñidas con GelRed™ (Biotium) se observaron en un transluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-Violet Products Inc). Los marcadores de tamaño molecular que se utilizaron fueron el DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *HindIII* o el marcador de 1 kb plus (Invitrogen).

9. Purificación de DNA en geles de agarosa

Para purificar el DNA que se utilizó en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. La presencia y concentración del DNA recuperado se verificó en un gel de agarosa al 1% (p/v) comparando con el marcador de tamaño molecular.

10. Tratamientos enzimáticos

Para realizar las técnicas de ligación del DNA y posterior clonación en un vector, el DNA tuvo que ser sometido a diferentes tratamientos enzimáticos, los cuales se describen a continuación:

10.1 Ligación de los productos de PCR en el vector pJET 1.2/Blunt

Los productos de PCR se ligaron en el vector pJET 1.2/Blunt manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) empleando el kit comercial CloneJET™ PCR Cloning kit (Fermentas) siguiendo las indicaciones del proveedor.

10.2 Ligación de los fragmentos de DNA en el vector pUCP20

Los fragmentos de DNA purificados se ligaron con el vector pUCP20 manteniendo una proporción 3:1 (inserto:vector) utilizando una unidad de la enzima DNA ligasa del fago T4 (Promega). La reacción se llevó a cabo a 4°C durante toda la noche.

10.3 Restricción con endonucleasas

El DNA purificado se digirió utilizando una unidad de la endonucleasa de restricción (Promega) por cada µg de DNA y se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se realizó el corrimiento electroforético de las mezclas de restricción en geles de agarosa al 1% para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

11. Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina

Para el aislamiento de plásmidos se utilizó el método de lisis (Adaptado de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1981), de acuerdo al siguiente protocolo:

Un cultivo bacteriano crecido en 4 ml de CL durante 18-20 h a 37°C con agitación constante se centrifugó durante 2 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Se decantó el

sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 100 µl de la solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM), y se le adicionó 20 µl de una solución de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. Posteriormente a la suspensión se le agregó 300 µl de la solución lítica recién preparada (NaOH 0.2 N y SDS 1%), se mezcló suavemente y se mantuvo durante 10 min en hielo. Transcurrido ese tiempo se le adicionó 300 µl de la solución de acetato de potasio 3 M pH 4.8, se mezcló ligeramente y se mantuvo 10 min en hielo. Se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se adicionaron 500 µl de la mezcla fenol:cloroformo (1:1), se mezcló moderadamente y se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa superior, se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se mantuvo durante 20 min a -80°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm a temperatura ambiente. El sedimento se lavó dos veces con 500 µl de etanol al 70% centrifugando durante 5 min a 12,000 rpm entre cada lavado, se recuperó el sedimento y se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla de DNA obtenida en 50 µl de agua desionizada y estéril. Se adicionó 5 µl de RNasa (100 mg/ml) y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se inactivó la RNasa incubando 15 min a 65°C. Las muestras se almacenaron a -20°C y se sometieron a corrimientos electroforéticos en geles de agarosa para determinar la presencia del plásmido.

12. Secuenciación de DNA

El DNA purificado se diluyó a 200 ng/µl y se envió para su secuenciación a una concentración de 3 µM, a CINVESTAV, Unidad Irapuato, México.

13. Preparación de células competentes de *E. coli*

Para la preparación de células competentes de *E. coli* JM101 se creció la cepa en 4 ml de CL a 37°C con agitación constante durante 18-24 h. Posteriormente se inoculó 250 ml de CL con los 4 ml del preinóculo y se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 590 nm. Posteriormente el cultivo se colocó en hielo por 20 min y a partir de este punto se mantuvieron siempre a una temperatura cercana a 4°C. Se centrifugó el cultivo por 10 min a 6,000 rpm a 4°C. La pastilla celular se lavó dos veces con 40 ml de agua desionizada, estéril y fría, centrifugando 10 min a 6,000 rpm a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10% estéril y frío y se almacenaron en alícuotas de 200 µl a -80°C.

14. Preparación de células competentes de *P. aeruginosa* y mutantes de *E. coli*

Para la preparación de células competentes de las cepas de *P. aeruginosa* PAO1 y mutantes de *E. coli* se siguió el método adaptado de Enderle y Farwell, (1988), el cual se describe a continuación: Se crecieron los cultivos en placas de AL durante 18-24 h a 37°C y posteriormente se transfirió una asada de células con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en 500 µl de agua desionizada estéril y fría. Las células se resuspendieron en vórtex hasta

que se formó una mezcla homogénea. Se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces con 500 µl de agua desionizada estéril y fría. Finalmente la pastilla se resuspendió en 500 µl de glicerol al 10% estéril y frío.

15. Transformación por el método de electroporación

A 100 µl de células competentes se les adicionó 1 µl de DNA a una concentración aproximada de 40 ng/µl; la mezcla se colocó en una celda para electroporación 215 (Eppendorf); la mezcla se sometió a un pulso eléctrico de 1.8 kilovoltios y se transfirió inmediatamente a un tubo con 2 ml de CL incubándose por 1 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente, se distribuyeron 100 µl del cultivo en placas de AL selectivo (100 µg/ml de ampicilina para *E. coli* y 400 µg/ml de carbenicilina para *P. aeruginosa*) incubándose a 37°C durante toda la noche.

16. Pruebas de susceptibilidad en medio líquido

De un cultivo de 4 ml de CN crecido durante la noche se tomaron 40 µl para inocular tubos con 4 ml del medio con concentraciones crecientes de arsenato [As(V)] ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y arsenito [As(III)] (NaAsO_2). Los tubos se incubaron 24 h a 37°C con agitación constante y la susceptibilidad se determinó en función de la turbidez de los cultivos al medir la absorbencia a 590 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21, Milton Roy.

17. Cinéticas de crecimiento de *B. xenovorans* LB400

Se promovió el crecimiento de la cepa realizando una dilución 1:25 de un cultivo crecido durante la noche a 30°C en matraces con 25 ml de CN y concentraciones crecientes de As(V) o As(III). Los matraces se incubaron a 30°C con agitación constante y el crecimiento de los cultivos se evaluó a intervalos en función de la absorbencia a 590 nm.

18. Ensayos de inducción de la resistencia a arsénico de *B. xenovorans* LB400

Se promovió el crecimiento de la cepa realizando una dilución 1:25 de un cultivo crecido durante la noche a 30°C en 4 matraces con 25 ml de CN; 1) Control sin adiciones, 2) Control del inductor, 3) Cultivo no inducido y 4) Cultivo inducido. A los matraces 2 y 4 a tiempo cero se les añadió 1/10 de la concentración de As(V) o As(III) determinada como tóxica en las cinéticas de crecimiento y a las 4 h, a los matraces 3 y 4 se les añadió la concentración tóxica de As(V) o As(III). Los matraces se incubaron a 30°C con agitación constante y el crecimiento de los cultivos se evaluó a intervalos en función de la absorbencia a 590 nm.

19. RT-PCR

19.1 Aislamiento de RNA

Se resuspendió el cultivo de *B. xenovorans* LB400 en 1 ml de reactivo TRI (Ambion) por cada $5-10 \times 10^6$ células, se incubó 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm

por 10 min a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Posteriormente se adicionaron 150 µl de cloroformo, se mezcló bien, se incubó 5 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se adicionaron 500 µl de isopropanol, se agitó, se incubó 8 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 8 min y se descartó el sobrenadante. Se adicionó 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min, se removió el etanol y se secó la pastilla de RNA. Por último, se resuspendió la pastilla en 50 µl de agua libre de nucleasas. El RNA total fue tratado con RQ1 RNase-Free DNase (Promega) utilizando una unidad por µg de RNA. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 2 h. Posteriormente se adicionó 1 µl de solución de paro y se procedió a incubar a 65°C durante 5 min para inactivar la DNasa. Las muestras fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa al 1.5% y se almacenaron a -70°C.

19.2 Amplificación

El RT-PCR se realizó con el RNA total y con el Kit Access RT-PCR System (Promega) de un solo paso, siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizaron las condiciones descritas en la **Tabla 7**. Los productos del RT-PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% (p/v) y se sometió a un corrimiento electroforético a un voltaje constante de 125 voltios durante 30 min. Posteriormente las bandas teñidas con GelRedTM (Biotium) se observaron en un transluminador de luz ultravioleta de onda corta (Ultra-Violet Products Inc). Los marcadores de tamaño molecular que se utilizaron fueron el DNA del fago lambda digerido con la endonucleasa *HindIII* o el marcador de 1 kb plus (Invitrogen).

Tabla 7. Condiciones empleadas para los ensayos de RT- PCR*.

Operón/Gen	Denominación	Síntesis de DNAc	Desnaturalización inicial °T/Tiempo	Amplificación (40 ciclos)			Extensión final °T/Tiempo
				Desnaturalización °T/Tiempo	Alineamiento °T/Tiempo	Extensión °T/Tiempo	
<i>arsR3acr3C₂H</i>	<i>arsR-acr3</i>	45 °C/45 min	95 ° /5 min	95 °C/30 seg	56.6 °C/30 seg	72 °C/1 min	72 °C/5 min
	<i>acr3-arsC</i>				50 °C/30 seg		
	<i>arsC-arsH</i>				56.6 °C/30 seg		
<i>Bxe_A1669</i>	<i>arsC1</i>				64 °C/30 seg	72 °C/45 seg	
<i>Bxe_B0304</i>	<i>arsR3</i>				56.5 °C/30 seg	72 °C/30 seg	
<i>Bxe_B1017</i>	<i>arsC3</i>				64 °C/30 seg	72 °C/45 seg	
<i>Bxe_B2062</i>	<i>arsB</i>				53 °C/30 seg	72 °C/1 min	
<i>Bxe_B3030</i>	<i>arsC4</i>				60 °C/30 seg	72 °C/30 seg	

* Se indica el nombre de los genes *ars*, la denominación asignada para cada fragmento amplificado y las condiciones utilizadas en los ensayos de PCR.

IX. RESULTADOS

Objetivo 1. Realizar un análisis *in silico* de los probables homólogos de las proteínas ArsB y ArsC presentes en el genoma de *B. xenovorans* LB400 y establecer relaciones filogenéticas de las proteínas ArsB y ArsC

1. Análisis filogenético de los probables transportadores de arsenito y arsenato reductasas de *B. xenovorans* LB400

El análisis preliminar del genoma de *B. xenovorans* LB400 indicó la presencia de 8 genes *arsR*, 3 *arsB*, 2 *arsC* y 1 *arsH* (Reyes-Gallegos, 2016) (**Figura 11**). Debido a que en este trabajo sólo se abordó el estudio de los genes que probablemente codifican un fenotipo de resistencia a especies inorgánicas de As [As(III) y As(V)], el estudio fue dirigido únicamente a los genes *arsB*, que codifican una bomba de expulsión de As(III), y *arsC*, que codifican una arsenato reductasa.

El análisis filogenético se realizó con el objetivo de verificar que las proteínas codificadas por los genes señalados como *arsB* y *arsC* pertenezcan a familias caracterizadas, identificar probables transportadores de As(III) y arsenato reductasas adicionales a los señalados en el genoma de LB400 y determinar el grupo filogenético al que pertenecen las proteínas codificadas por dichos genes.

Con la finalidad de facilitar el manejo de las secuencias utilizadas en los análisis, a las proteínas codificadas por los genes *Bxe_A1054*, *Bxe_B0303* y *Bxe_B2062*, señalados como *arsB*, se les asignó el nombre ArsB1, ArsB2 y ArsB3, respectivamente, y a los productos de los genes *Bxe_B0302* y *Bxe_B3030*, señalados como *arsC*, se les asignó el nombre ArsC1 y ArsC2 (**Tabla 8**).

El procedimiento general del análisis consistió primeramente en elaborar una base de datos de probables transportadores de As(III) y arsenato reductasas de LB400, para lo cual se realizó un Blastp con el genoma de LB400, utilizando como molde las proteínas de los organismos donde fueron caracterizadas por primera vez (**Tablas 2 y 3**). Concluida la base de datos de cada grupo de proteínas, se procedió a realizar alineamientos múltiples para determinar si existe homología entre las proteínas de LB400 y las caracterizadas; se fueron descartando secuencias al considerar los valores de identidad obtenidos y la localización en los árboles generados a partir de los alineamientos, y finalmente con el grupo de proteínas que se mantuvo como probables transportadores de As(III) y arsenato reductasas se elaboraron árboles filogenéticos. Cabe señalar que el análisis de cada grupo de proteínas concluyó en diferentes etapas del procedimiento mencionado anteriormente.

1.1 Transportadores de arsenito

1.1.1 ArsB

Tabla 8. Genes *arsB* y *arsC* de *B. xenovorans* LB400*.

Replicón	<i>arsB</i>	<i>arsC</i>	
Cromosoma 1	<i>Bxe_A1054</i> <i>ArsB1</i>	-	
Cromosoma 2	<i>Bxe_B0303</i> <i>ArsB2</i>	<i>Bxe_B0302</i> <i>ArsC1</i>	Operón <i>arsRBCH</i>
	<i>Bxe_B2062</i> <i>ArsB3</i>	<i>Bxe_B3030</i> <i>ArsC2</i>	

* Se indica la ubicación y el código de acceso de los genes *arsB* (morado) y *arsC* (amarillo) indicados en la base de datos del genoma de *Burkholderiales*. En verde se señalan los genes que forman parte del operón *arsRBCH* de *B. xenovorans* LB400.

La base de datos generada a partir de los análisis Blastp con las proteínas ArsB molde R773 y pI258 concluyó con 38 proteínas, incluyendo a ArsB1 y ArsB3, pero no agrupando a ArsB2. Para establecer la relación entre el grupo de proteínas seleccionadas se elaboró un alineamiento múltiple, obteniendo los porcentajes de identidad de las proteínas (**Figura 15**) y un árbol basado en el alineamiento (**Figura 16**). El reporte de identidades mostró que ArsB1 presenta 9.4 y 9.9% de identidad con las ArsB R773 y pI258, respectivamente; mientras que ArsB3 presenta 21.4 y 22.0%, respectivamente. Del resto de las proteínas en análisis Bxe_B2638 y Bxe_C0981 presentaron los mayores valores de identidad (17-21%) con las proteínas molde (**Figura 15**). Al observar el árbol del alineamiento se corroboran los datos numéricos mencionados anteriormente, ArsB3 claramente se agrupó en una misma rama con las ArsB R773 y pI258; además de que Bxe_B2638 y Bxe_C0981 se encuentran relativamente cercanas a éstas. En el caso de ArsB1, se ubica alejada de las proteínas molde, agrupada con otras de las proteínas de LB400 (**Figura 16**). El hecho de que ArsB1 presentara valores de identidad relativamente bajos con las ArsB R773 y pI258, además de ubicarse distante a éstas en el árbol del alineamiento, condujo a descartar a ArsB1 como probable transportador de As(III).

Por otra parte, se continuó con el análisis de las tres proteínas restantes: ArsB3, Bxe_B2638 y Bxe_C0981. La probable función de cada una de ellas difiere; ArsB3 es la única indicada como probable ArsB mientras que Bxe_B2638 está señalada como un probable transportador ABC de sulfonato y Bxe_C0981 como un transportador ABC de nitrato/sulfonato/bicarbonato; sin embargo, ninguna de ellas está caracterizada. Por lo tanto, se decidió realizar un alineamiento múltiple de las proteínas con las ArsB R773 y pI258, para posteriormente elaborar árboles filogenético con los métodos Neighbor Joining y Mínima Evolución con Bootstrap 1000, y determinar si las proteínas presentaban una relación evolutiva con los transportadores de As(III) caracterizados. En el alineamiento múltiple se obtuvieron los porcentajes de identidad de las proteínas a comparar (**Figura 17A**), donde ArsB3 presentó los mayores valores de identidad con las ArsB R773 y pI258 (25.2 y 26.6%, respectivamente). Además, en el árbol obtenido del alineamiento fue la única proteína que se agrupó con las proteínas modelo, mientras que Bxe_B2638 y Bxe_C0981 se agruparon entre ellas (**Figura 17B**). En el caso de los árboles filogenéticos, con ambos métodos se obtuvo nuevamente a ArsB3 agrupándose con las ArsB caracterizadas (**Figura 18**). Estos resultados permitieron concluir que ArsB3 probablemente es un transportador de As(III) perteneciente a la familia ArsB, no siendo el caso de Bxe_B2638 y Bxe_C0981, las cuales fueron descartadas del análisis.

1.1.2 Acr3

Para el caso de las proteínas Acr3, la base de datos fue generada a partir de la proteína molde Tn Acr3 (**Tabla 2**) y concluyó con 12 probables Acr3, incluyendo a la proteína señalada como ArsB2 de LB400.

Se realizó el alineamiento de las 12 probables proteínas Acr3, obteniendo los valores de

		Percent Identity																																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40			
1	█	11.1	11.9	10.9	15.3	10.3	13.0	13.0	9.1	9.1	9.4	9.1	44.0	13.0	8.3	10.1	5.8	8.1	7.3	12.2	7.8	7.3	8.7	9.9	9.8	8.6	11.1	12.3	10.3	9.6	9.7	9.5	10.2	6.5	13.0	11.1	12.7	7.5	8.3	10.0	1	Bxe_A0163	
2	451.0	█	9.2	7.7	6.8	9.9	14.2	12.3	9.4	10.7	6.5	9.6	10.2	5.9	7.1	5.0	5.9	10.2	6.5	7.7	8.4	7.9	12.9	11.3	8.0	10.0	10.7	7.9	13.6	7.3	9.8	10.3	6.5	7.8	6.7	10.7	8.9	6.0	9.3	7.3	2	Bxe_A0721	
3	418.0	577.0	█	11.9	10.9	14.4	9.6	12.4	10.4	9.5	10.1	10.0	8.8	9.6	10.8	9.1	10.5	12.5	6.8	11.9	9.8	7.8	13.1	11.5	10.9	7.1	7.4	13.7	7.4	7.6	9.4	9.8	10.1	7.3	9.6	9.6	10.6	11.1	6.5	4.4	3	Bxe_A0745	
4	466.0	754.0	422.0	█	12.6	11.2	8.4	8.8	10.8	10.2	9.3	8.5	10.7	9.3	8.4	8.1	7.0	10.2	9.6	12.1	8.1	7.0	11.4	8.6	9.8	8.6	11.1	10.7	7.9	8.9	8.9	9.2	9.2	8.0	5.8	11.5	9.8	8.5	9.4	9.9	4	ArsB1	
5	321.0	1000.0	466.0	396.0	█	11.1	11.9	10.1	11.6	14.1	11.6	12.5	20.9	16.0	9.5	35.5	10.7	9.8	8.8	13.9	13.0	9.4	8.6	9.3	8.4	20.7	10.6	13.8	12.3	7.7	10.8	9.2	11.1	5.5	25.9	11.2	34.8	10.3	11.4	9.8	5	Bxe_A1320	
6	493.0	524.0	344.0	447.0	456.0	█	14.5	7.4	10.3	12.1	9.7	7.8	8.3	12.4	9.7	8.7	9.3	12.1	11.0	11.7	9.0	9.4	9.6	10.2	14.3	10.3	11.2	9.3	10.7	7.4	11.2	13.9	10.3	12.0	6.2	11.2	7.9	10.2	12.9	11.0	6	Bxe_A1445	
7	493.0	349.0	538.0	649.0	418.0	339.0	█	16.8	8.8	17.2	11.0	12.8	10.1	12.5	13.6	10.9	4.7	13.1	11.4	14.4	11.7	11.0	12.1	11.7	11.1	8.1	10.0	9.8	19.9	12.1	8.1	11.3	7.0	8.6	11.6	9.1	10.7	10.4	13.3	10.7	7	Bxe_A1467	
8	380.0	403.0	403.0	605.0	504.0	845.0	294.0	█	5.5	12.4	8.9	10.7	9.9	14.9	8.5	5.8	9.4	10.3	9.2	11.1	10.7	8.1	12.2	11.0	7.1	8.5	8.5	10.9	23.8	9.2	8.6	8.8	8.1	6.4	10.1	8.9	7.8	8.2	10.4	11.2	8	Bxe_A1953	
9	577.0	560.0	493.0	466.0	434.0	498.0	615.0	1000.0	█	8.2	12.1	11.9	10.4	3.7	10.6	10.5	9.3	12.2	7.1	10.0	8.1	8.7	11.3	9.7	10.8	6.8	7.6	7.9	8.3	8.7	12.0	9.1	9.3	7.6	10.2	8.6	8.3	9.6	10.6	9	Bxe_A2078		
10	577.0	471.0	545.0	498.0	352.0	414.0	285.0	399.0	688.0	█	9.3	7.5	10.0	14.2	10.3	10.3	8.1	10.3	7.3	8.0	13.9	4.8	9.7	12.1	9.5	9.2	11.6	6.1	12.7	7.2	7.9	11.1	11.9	8.4	9.2	10.0	7.8	8.4	9.5	8.0	10	Bxe_A2468	
11	560.0	1000.0	0511.0	569.0	430.0	538.0	456.0	605.0	414.0	560.0	█	9.7	9.1	6.5	7.7	9.1	10.5	11.3	8.1	11.7	7.9	5.7	13.1	9.4	9.0	6.4	9.0	10.7	13.6	9.3	10.9	10.9	7.6	11.0	11.3	10.1	10.1	8.8	10.0	10.3	11	Bxe_A2951	
12	577.0	538.0	517.0	649.0	399.0	754.0	389.0	476.0	422.0	796.0	531.0	█	9.8	7.4	9.0	9.1	14.0	10.6	8.7	14.0	8.6	5.4	9.2	9.0	11.7	6.8	9.3	8.4	10.2	8.8	13.0	8.0	10.4	6.5	6.2	8.6	8.7	10.1	8.4	10.3	12	Bxe_A3111	
13	97.6	498.0	615.0	476.0	236.0	675.0	504.0	524.0	493.0	517.0	577.0	531.0	█	14.0	6.6	13.0	9.4	10.7	8.5	10.1	9.4	9.6	8.9	7.9	9.2	10.3	12.6	8.5	10.5	8.4	11.4	8.7	10.6	9.1	14.2	12.2	14.6	7.3	11.3	9.8	13	Bxe_A3118	
14	383.0	1000.0	0538.0	569.0	307.0	403.0	399.0	332.0	1000.0	0349.0	1000.0	0819.0	352.0	█	9.3	15.7	2.5	14.2	13.0	7.7	9.3	7.5	12.3	9.3	12.0	15.7	11.2	8.6	10.0	13.2	7.6	9.4	11.2	3.7	10.3	11.2	9.3	8.5	12.0	10.2	14	Bxe_A3353	
15	675.0	945.0	466.0	649.0	545.0	531.0	365.0	649.0	476.0	498.0	775.0	595.0	1000.0	0560.0	█	10.3	11.6	10.8	7.3	8.7	7.2	7.3	11.0	11.4	9.2	5.9	12.4	10.7	5.7	6.8	10.2	8.3	7.8	9.1	5.9	12.4	10.8	11.0	11.1	9.1	15	Bxe_A3598	
16	504.0	1000.0	0577.0	688.0	130.1	626.0	466.0	1000.0	0482.0	498.0	577.0	577.0	380.0	313.0	493.0	█	4.7	11.9	9.4	9.5	10.9	7.4	10.5	7.2	9.8	15.0	9.2	11.5	11.0	7.3	7.5	8.7	10.8	6.3	23.5	9.2	30.0	10.4	12.6	9.3	16	Bxe_A3686	
17	1000.0	0000.0	487.0	1000.0	0471.0	560.0	1000.0	0553.0	560.0	688.0	487.0	354.0	553.0	1000.0	0430.0	1000.0	█	5.8	8.1	10.5	7.0	7.0	5.8	7.0	7.0	4.7	5.5	6.1	8.2	12.8	5.8	7.0	7.0	7.0	8.1	5.5	11.6	3.5	4.7	5.8	17	Bxe_A3718	
18	703.0	498.0	399.0	504.0	524.0	414.0	380.0	493.0	407.0	493.0	442.0	476.0	471.0	349.0	466.0	418.0	1000.0	█	8.0	12.5	8.9	10.2	11.4	12.9	11.2	10.9	14.9	8.4	11.5	10.2	12.9	7.7	11.6	5.9	10.1	14.5	11.4	8.4	11.6	8.8	18	Bxe_A4020	
19	874.0	1000.0	0000.0	545.0	615.0	456.0	442.0	569.0	907.0	845.0	688.0	615.0	649.0	383.0	874.0	560.0	688.0	719.0	█	6.4	6.6	7.3	11.1	8.6	7.1	7.8	8.0	9.9	8.3	6.5	8.1	9.7	8.1	5.7	9.4	8.8	9.6	7.1	9.2	8.5	19	Bxe_B0471	
20	407.0	754.0	422.0	414.0	357.0	430.0	342.0	451.0	517.0	719.0	426.0	354.0	511.0	775.0	626.0	545.0	487.0	399.0	1000.0	█	10.7	6.4	13.5	10.7	12.4	6.4	13.3	8.6	14.5	9.1	11.3	9.0	11.0	7.9	6.1	14.2	10.9	8.8	9.6	8.5	20	Bxe_B0640	
21	754.0	661.0	531.0	703.0	383.0	586.0	430.0	476.0	688.0	357.0	736.0	626.0	560.0	569.0	907.0	461.0	1000.0	0605.0	1000.0	0476.0	█	7.8	13.4	14.2	13.1	7.3	11.1	9.2	11.3	7.0	8.7	7.7	9.7	8.5	10.2	12.5	9.9	8.2	10.7	9.7	21	Bxe_B1043	
22	845.0	736.0	754.0	1000.0	0560.0	553.0	461.0	703.0	626.0	1000.0	0000.0	0545.0	819.0	845.0	819.0	1000.0	0504.0	874.0	1000.0	0736.0	█	8.1	11.6	5.1	7.9	6.9	5.3	10.9	21.9	7.2	7.0	7.2	7.2	9.1	6.9	8.5	11.1	9.5	7.0	22	Bxe_B1769		
23	615.0	383.0	377.0	442.0	637.0	538.0	410.0	407.0	447.0	531.0	377.0	577.0	605.0	407.0	461.0	482.0	1000.0	0438.0	451.0	365.0	368.0	688.0	█	9.6	10.7	6.9	11.3	7.8	11.0	8.4	9.1	11.0	10.7	8.3	5.9	11.3	10.2	10.1	9.8	9.8	23	Bxe_B1783	
24	524.0	442.0	434.0	637.0	569.0	498.0	430.0	456.0	538.0	410.0	560.0	595.0	719.0	569.0	442.0	874.0	1000.0	0386.0	626.0	471.0	349.0	430.0	538.0	█	7.1	7.2	11.2	3.8	9.4	9.7	8.4	10.3	7.9	7.7	9.3	12.3	5.8	10.4	11.3	8.0	24	Bxe_B1836	
25	524.0	719.0	466.0	524.0	649.0	347.0	451.0	907.0	471.0	553.0	586.0	430.0	577.0	414.0	569.0	524.0	1000.0	0451.0	907.0	403.0	377.0	1000.0	0476.0	907.0	█	9.9	12.3	8.5	11.5	8.4	9.9	10.1	11.6	8.4	9.9	13.0	9.9	9.1	21.4	22.0	25	ArsB3	
26	637.0	511.0	907.0	626.0	237.0	493.0	703.0	649.0	1000.0	0577.0	1000.0	0000.0	498.0	313.0	1000.0	0330.0	1000.0	0461.0	754.0	1000.0	0874.0	719.0	1000.0	0907.0	524.0	█	9.5	6.2	9.1	8.5	9.6	7.4	7.1	8.9	15.8	10.2	18.1	11.0	11.1	8.0	26	Bxe_B2620	
27	451.0	471.0	819.0	451.0	482.0	447.0	511.0	649.0	524.0	430.0	595.0	560.0	396.0	447.0	399.0	577.0	1000.0	0330.0	703.0	371.0	451.0	1000.0	0442.0	451.0	403.0	553.0	█	10.7	9.4	9.2	12.4	9.1	11.7	8.3	10.1	9.2	1.9	9.8	9.6	21.5	18.3	27	Bxe_B2638
28	403.0	736.0	360.0	476.0	357.0	560.0	531.0	461.0	775.0	1000.0	0476.0	661.0	637.0	626.0	476.0	434.0	1000.0	0661.0	517.0	637.0	577.0	1000.0	0754.0	1000.0	0649.0	1000.0	0471.0	█	9.4	5.3	9.9	6.1	11.5	9.9	9.9	10.7	14.6	8.4	6.2	2.3	28	Bxe_B2648	
29	498.0	365.0	845.0	719.0	403.0	471.0	246.0	206.0	719.0	389.0	365.0	504.0	482.0	517.0	1000.0	0461.0	675.0	434.0	661.0	339.0	442.0	461.0	456.0	553.0	438.0	586.0	560.0	560.0	█	9.4	9.9	8.7	7.5	5.4	6.1	10.7	7.2	8.9	10.3	9.1	29	Bxe_B2705	
30	538.0	874.0	796.0	595.0	775.0	845.0	414.0	569.0	675.0	907.0	560.0																																

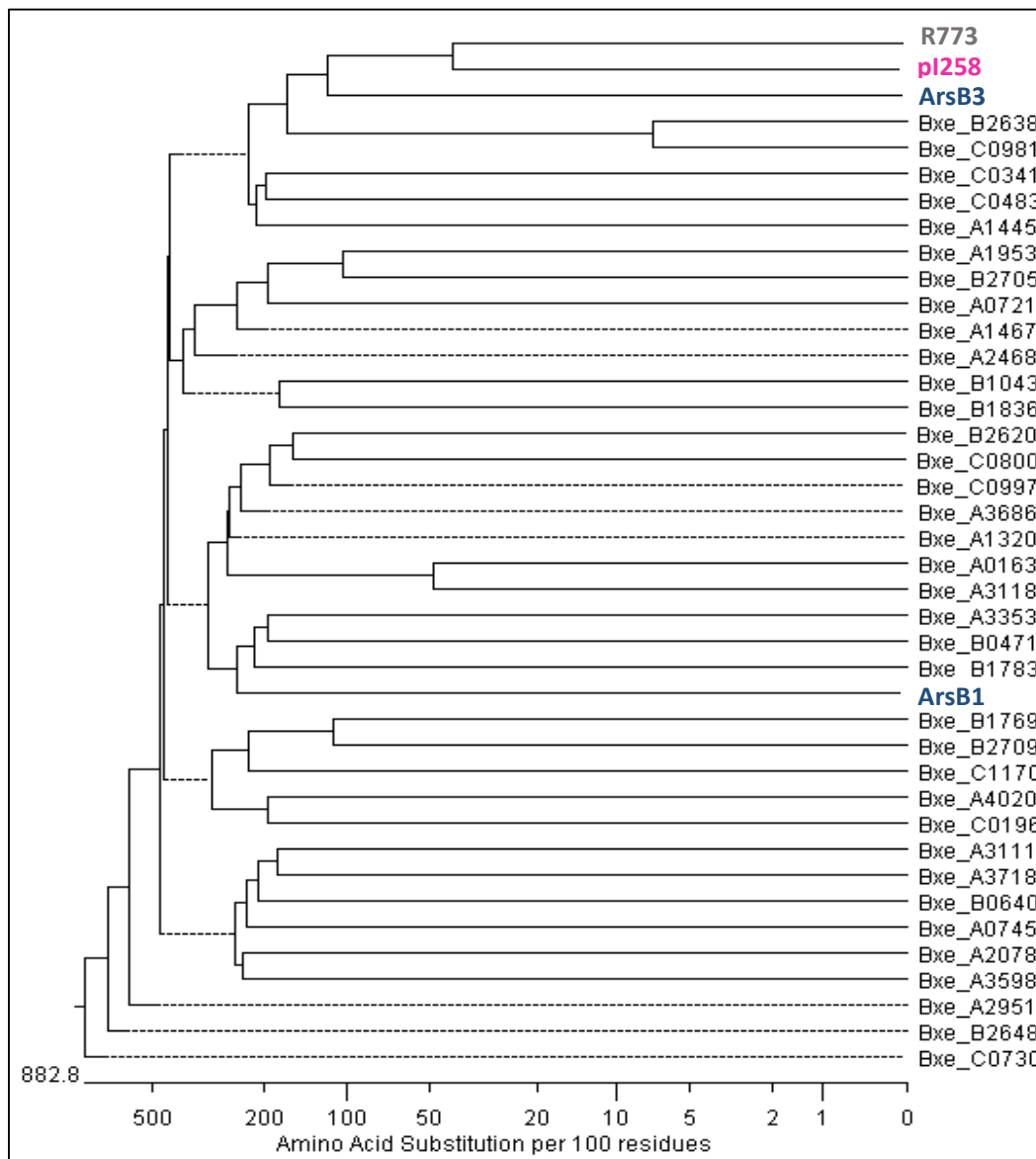


Figura 16. Selección de transportadores de As(III) ArsB de *B. xenovorans* LB400. Se muestra el árbol del alineamiento múltiple de probables proteínas ArsB, señalando las proteínas ArsB caracterizadas en los plásmidos R773 (gris) y pI258 (rosa) y las proteínas señaladas en el genoma de *B. xenovorans* LB400 como ArsB (azul), además de las proteínas adicionales obtenidas en los análisis Blastp. Las líneas discontinuas indican los gaps insertados por cada 100 aminoácidos sustituidos. Alineamiento realizado mediante Clustal W.

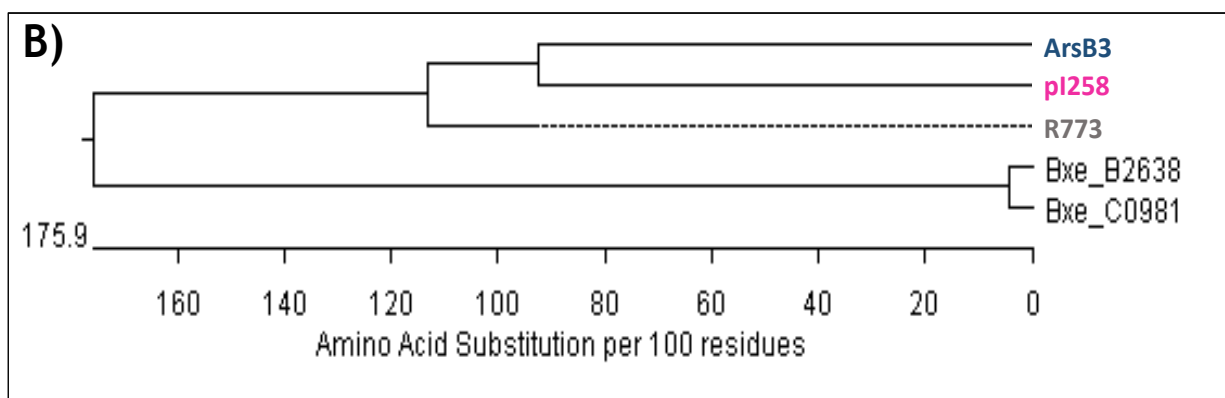
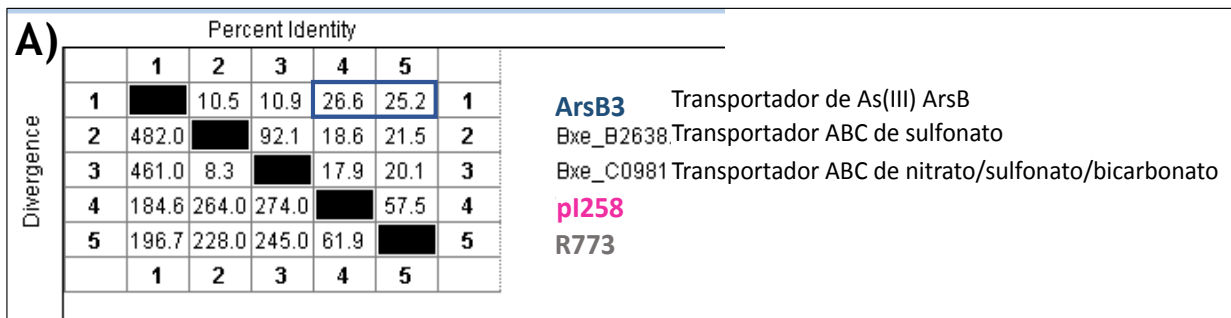


Figura 17. Búsqueda y selección de proteínas ArsB de *B. xenovorans* LB400. **A.** Reporte de relaciones de identidad y divergencia del alineamiento múltiple; en azul se señalan los porcentajes de identidad de ArsB3 (25.2 y 26.6%) con las ArsB modelo. Se indica la función predicha de las proteínas de *B. xenovorans* LB400. **B.** Árbol del alineamiento múltiple. Se señalan las proteínas ArsB caracterizadas en los plásmidos R773 (gris) y pI258 (rosa). Las líneas discontinuas indican los gaps insertados por cada 100 aminoácidos sustituidos. Alineamiento realizado mediante Clustal W.

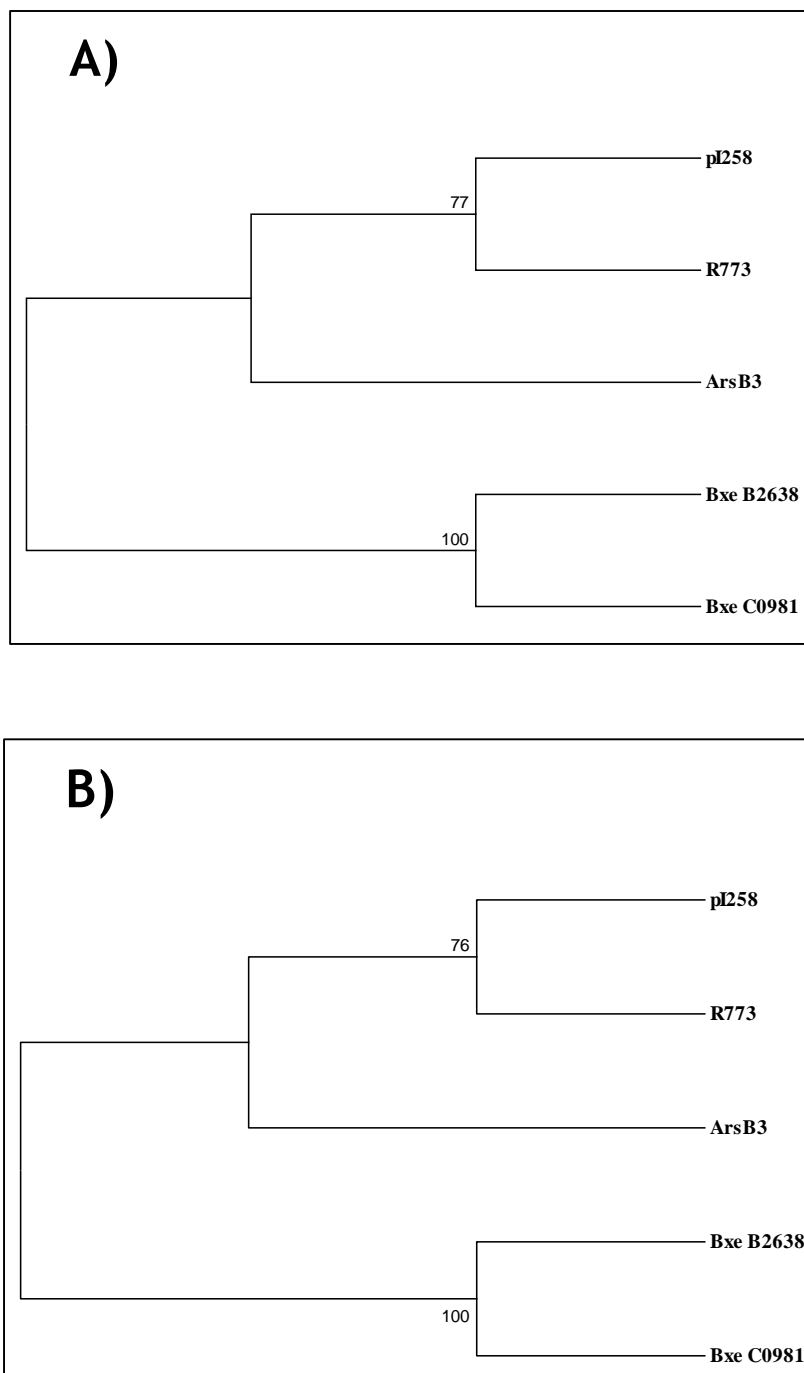


Figura 18. Relaciones filogenéticas de las proteínas ArsB de *B. xenovorans* LB400. Se muestran los árboles filogenéticos de las probables proteínas ArsB, donde se indican las proteínas ArsB caracterizadas en los plásmidos R773 (gris) y pI258 (rosa) y la proteína señalada en el genoma de *B. xenovorans* LB400 como ArsB3 (azul). **A.** Neighbor Joining. **B.** Mínima Evolución. Bootstrap 1000.

identidad con la proteína molde Tn Acr3 (**Figura 19**) y el árbol generado a partir del alineamiento (**Figura 20**). En la tabla de porcentajes de identidad, ArsB2 fue la única proteína que presentó un valor relativamente elevado (26.7%) con la Acr3 molde (**Figura 19**), lo cual fue claramente representado en el árbol del alineamiento donde se ubicó en la misma rama que la proteína caracterizada (**Figura 20**); en el árbol también se observa a Bxe_B1806 ubicada junto con Tn Acr3 y ArsB2, sin embargo, no se consideró relevante debido a que en la tabla de identidades presentó un valor de 9.1% con la Acr3 molde (**Figuras 19 y 20**). Debido a esto se concluye que la proteína señalada como ArsB2 en el genoma de LB400 corresponde probablemente a un transportador de As(III) de la familia Acr3.

Por parte de los transportadores de As(III), los análisis anteriores permiten concluir que ArsB2 forma parte de la familia de transportadores Acr3, ArsB3 probablemente pertenece a la familia de transportadores ArsB, y ArsB1 no pertenece a ninguna de las familias de transportadores de As(III) caracterizados.

1.2 Arsenato reductasas

En el genoma de LB400 se señalan dos genes *arsC* (**Figura 11**) que codifican probables ArsC: *Bxe_B0302* (ArsC1), formando parte del operón *arsRBCH* y *Bxe_B3030* (ArsC2), localizada de forma individual (**Tabla 8**).

1.2.1 ArsC_{Grx/GSH}

La base de datos generada con la proteína ArsC_{Grx/GSH} identificada en el plásmido R773 de *E. coli* (**Tabla 3**) consistió en 15 proteínas, donde se incluyen a ArsC1 y ArsC2 indicadas en el genoma de LB400 (**Tabla 3**). Inicialmente, se realizó un alineamiento múltiple de las 15 proteínas con R773 Grx/GSH, cuyas relaciones de identidad se establecieron con la tabla de porcentajes de identidad (**Figura 21**) y el árbol obtenido con el alineamiento (**Figura 22**). ArsC1 y ArsC2 presentaron valores relativamente elevados de identidad con la R773 Grx/GSH (65.7 y 41.7%, respectivamente). Además sobresalen Bxe_A1669 y Bxe_B1460, que aunque presentaron valores bajos con la ArsC Grx/GSH molde (16-18%), obtuvieron un valor relativamente elevado (23%) con ArsC2 (**Figura 21**); cabe señalar que ambas proteínas se indican en el genoma de LB400 como proteínas hipotéticas. En el caso del árbol obtenido, ArsC1 y ArsC2 se localizan en la misma rama de R773 Grx/GSH, junto con Bxe_B0451, mientras que el resto de las proteínas, incluyendo a Bxe_A1669 y Bxe_B1460, se ubican en ramas separadas (**Figura 22**). Hasta este punto, los resultados obtenidos indican que ArsC1 y ArsC2 probablemente son arsenato reductasas pertenecientes a la familia Grx/GSH; sin embargo, debido a que no es clara la relación de Bxe_A1669, Bxe_B0451 y Bxe_B1460 con R773 Grx/GSH, se consideró necesario realizar un análisis más amplio para determinar si dichas proteínas presentaban relación evolutiva con las ArsC. El análisis consistió en comparar las proteínas de LB400 con ArsC caracterizadas en otras especies; los resultados se muestran posterior al análisis de las arsenato reductasas de la familia Trx, debido a que el

		Percent Identity														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
Divergence	1	█	11.7	7.8	11.0	10.2	8.3	8.9	12.2	10.6	6.4	8.9	7.5	8.0	1	Bxe_A0774
	2	430.0	█	12.1	8.6	12.4	10.6	12.4	13.1	16.2	10.9	15.8	14.3	9.4	2	Bxe_A1654
	3	736.0	414.0	█	12.3	9.5	7.8	12.8	12.3	12.1	11.2	9.3	13.0	10.3	3	Bxe_A3302
	4	456.0	626.0	407.0	█	8.9	12.2	8.7	12.2	8.0	8.3	12.3	10.7	6.6	4	Bxe_A3946
	5	504.0	403.0	553.0	605.0	█	8.1	37.1	10.5	19.5	8.8	16.4	10.3	6.5	5	Bxe_B0074
	6	661.0	476.0	736.0	410.0	688.0	█	9.0	12.3	10.8	10.7	10.3	16.8	26.7	6	ArsB2
	7	605.0	403.0	386.0	626.0	123.0	595.0	█	11.6	20.2	8.4	15.1	11.5	8.1	7	Bxe_B1053
	8	407.0	380.0	403.0	407.0	487.0	407.0	430.0	█	9.4	11.8	8.0	12.2	7.6	8	Bxe_B1357
	9	476.0	303.0	410.0	703.0	253.0	466.0	243.0	553.0	█	8.8	13.5	9.0	7.4	9	Bxe_B1663
	10	1000.0	461.0	451.0	661.0	605.0	476.0	661.0	426.0	615.0	█	9.7	9.1	9.1	10	Bxe_B1806
	11	595.0	313.0	560.0	403.0	299.0	493.0	328.0	719.0	368.0	538.0	█	9.7	9.0	11	Bxe_B2297
	12	796.0	344.0	383.0	471.0	493.0	294.0	434.0	410.0	586.0	577.0	538.0	█	7.4	12	Bxe_C0128
	13	719.0	560.0	498.0	1000.0	1000.0	183.7	688.0	775.0	845.0	586.0	586.0	819.0	█	13	Tn Acr3
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13			

Figura 19. Búsqueda de transportadores de As(III) Acr3 de *B. xenovorans* LB400. Se indica la tabla de relaciones de identidad y divergencia del alineamiento múltiple de probables proteínas Acr3, en azul se señala el porcentaje de identidad de la proteína ArsB2 (26.7%) con la Acr3 molde (turquesa). Alineamiento realizado mediante Clustal W.

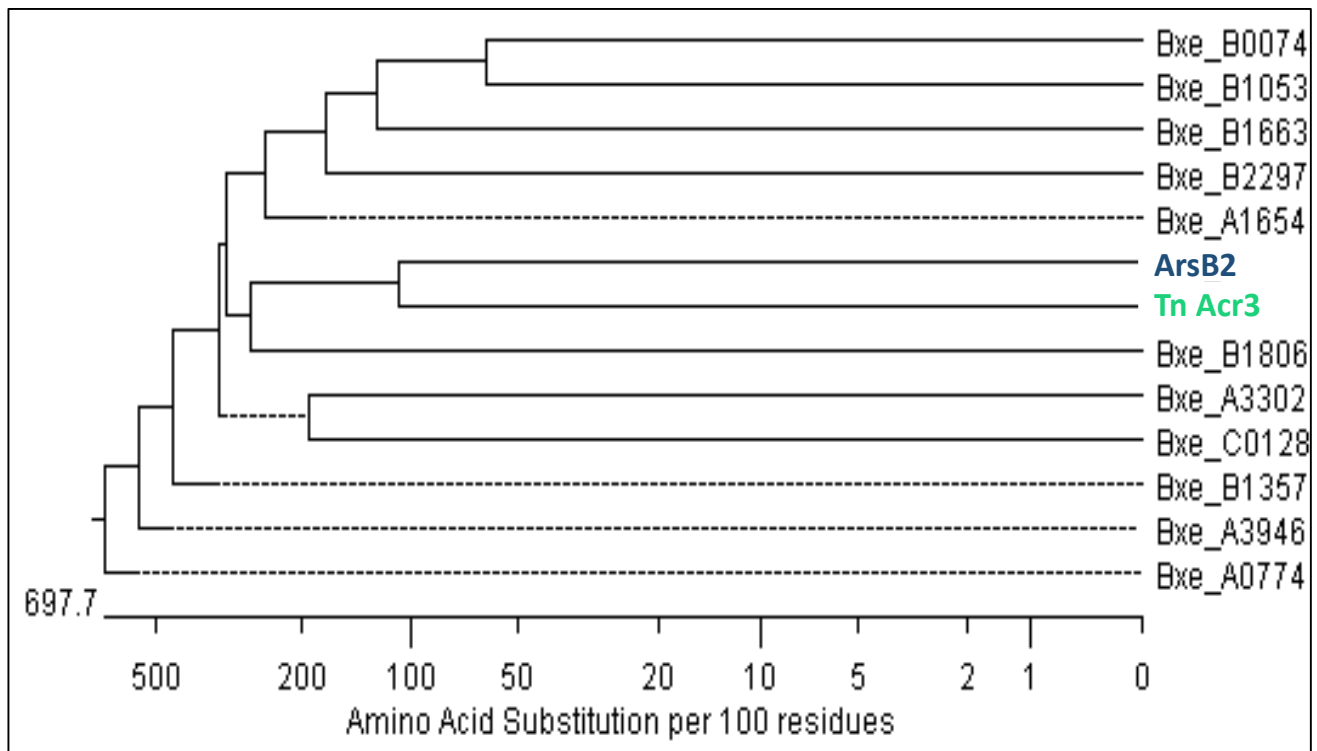


Figura 20. Selección de proteínas Acr3 de *B. xenovorans* LB400. Se muestra el árbol del alineamiento múltiple de probables proteínas Acr3, señalando la proteína Tn Acr3 caracterizada en *B. subtilis* (turquesa), la proteína ArsB2 señalada en el genoma de *B. xenovorans* LB400 como ArsB (azul), además de las proteínas adicionales obtenidas en los análisis Blastp. Las líneas discontinuas indican los gaps insertados por cada 100 aminoácidos sustituidos. Alineamiento realizado mediante Clustal W.

		Percent Identity																	
Divergence		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
	1	█	7.9	6.5	3.5	15.1	8.7	7.0	10.6	7.6	10.0	9.7	6.5	14.9	6.6	8.4	8.5	1	Bxe_C0290
	2	719.0	█	9.2	10.3	8.5	9.9	9.3	9.4	8.3	10.9	6.5	6.0	6.4	7.5	8.8	8.0	2	Bxe_A0200
	3	1000.0	569.0	█	7.8	10.0	12.5	9.3	11.0	12.0	13.7	9.7	7.0	8.7	6.7	8.7	8.6	3	Bxe_A1074
	4	1000.0	498.0	754.0	█	2.5	7.9	9.1	10.2	8.9	5.0	26.9	8.9	8.1	6.1	5.9	5.7	4	Bxe_A1660
	5	325.0	637.0	517.0	1000.0	█	19.0	11.6	8.4	5.8	18.4	9.9	13.2	20.4	8.4	23.0	18.3	5	Bxe_A1669
	6	626.0	524.0	399.0	719.0	258.0	█	11.5	10.7	8.6	17.1	10.1	13.4	12.7	9.3	16.0	14.9	6	Bxe_A1688
	7	945.0	560.0	569.0	586.0	434.0	438.0	█	8.4	8.6	8.6	9.0	6.4	10.6	12.3	10.1	10.6	7	Bxe_A2381
	8	476.0	553.0	461.0	504.0	649.0	471.0	649.0	█	6.9	11.6	10.8	10.4	10.7	6.7	12.0	10.1	8	Bxe_A3217
	9	796.0	675.0	414.0	605.0	1000.0	637.0	626.0	1000.0	█	10.0	6.6	5.7	9.9	7.2	14.3	9.9	9	Bxe_A4188
	10	517.0	461.0	362.0	1000.0	267.0	287.0	637.0	434.0	517.0	█	12.1	18.6	17.5	12.3	40.9	65.7	10	ArsC1
	11	538.0	1000.0	538.0	182.1	517.0	511.0	595.0	466.0	1000.0	410.0	█	7.7	8.7	8.0	11.1	10.6	11	Bxe_B0373
	12	1000.0	1000.0	1000.0	605.0	374.0	371.0	1000.0	493.0	1000.0	265.0	754.0	█	13.8	7.5	18.3	14.9	12	Bxe_B0451
	13	330.0	1000.0	626.0	703.0	241.0	393.0	482.0	476.0	517.0	281.0	626.0	360.0	█	15.1	23.0	16.7	13	Bxe_B1460
	14	1000.0	819.0	1000.0	1000.0	649.0	569.0	403.0	1000.0	907.0	403.0	703.0	819.0	328.0	█	14.5	6.5	14	Bxe_B2046
	15	649.0	605.0	626.0	1000.0	212.0	309.0	511.0	418.0	347.0	108.2	451.0	270.0	212.0	339.0	█	41.7	15	ArsC2
	16	637.0	719.0	637.0	1000.0	270.0	332.0	476.0	511.0	517.0	45.6	476.0	332.0	296.0	1000.0	105.1	█	16	R773
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		Grx/GSH	

Figura 21. Búsqueda de proteínas ArsC_{Grx/GSH} de *B. xenovorans* LB400. Se indica la tabla de relaciones de identidad y divergencia del alineamiento múltiple de probables proteínas ArsC_{Grx/GSH}, en azul se señalan los porcentajes de identidad de las proteínas ArsC1 (65.7 y 40.9%) y ArsC2 (41.7%) con la ArsC_{Grx/GSH} molde (gris) y en amarillo, porcentajes de identidad relativamente elevados de proteínas de *B. xenovorans* LB400 con ArsC2 (Bxe_A1669, 18.3 y 23.0%; Bxe_B1460, 16.7 y 23.0 %). Alineamiento realizado mediante Clustal W.

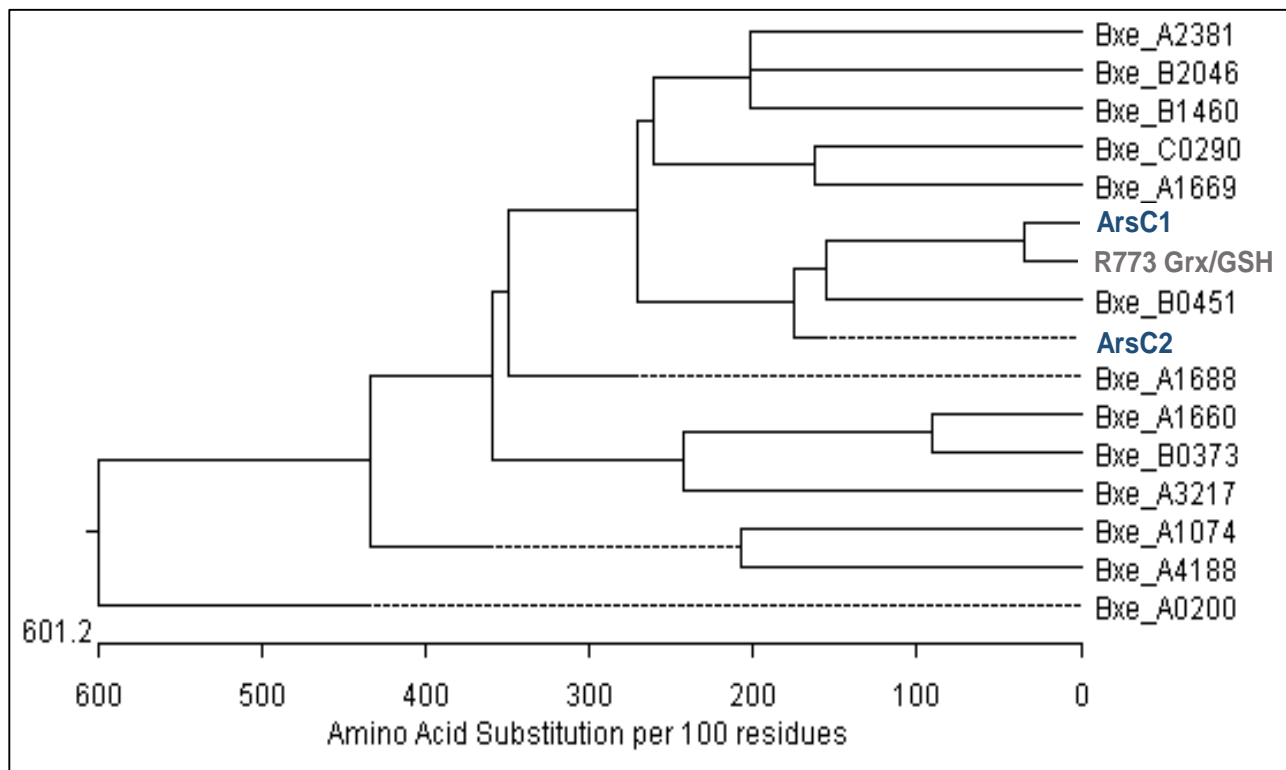


Figura 22. Selección de proteínas $ArsC_{Grx/GSH}$ de *B. xenovorans* LB400. Se muestra el árbol del alineamiento múltiple de probables proteínas $ArsC_{Grx/GSH}$, señalando la $ArsC_{Grx/GSH}$ caracterizada en *E. coli* (gris), las proteínas $ArsC1$ y $ArsC2$ indicada en el genoma de *B. xenovorans* LB400 como $ArsC$ (azul), además de las proteínas adicionales obtenidas en los análisis Blastp. Las líneas discontinuas indican los gaps insertados por cada 100 aminoácidos sustituidos. Alineamiento realizado mediante Clustal W.

análisis incluyó a ambas familias de ArsC.

1.2.2 ArsC_{Trx}

Para llevar a cabo las comparaciones correspondientes al análisis de las proteínas ArsC_{Trx}, se utilizó como proteína molde a ArsC_{Trx} del plásmido pI258 de *S. aureus*, ya que fue la primera proteína de esta familia caracterizada (**Tabla 3**). La base de datos generada concluyó con 20 proteínas, entre las cuales no se incluye ninguna de las ArsC indicadas inicialmente dentro del genoma de LB400. Se realizó el alineamiento múltiple de las 20 proteínas; el reporte de porcentajes de identidad resaltó cinco proteínas con valores relativamente elevados de identidad (20-24%) con la ArsC_{Trx} molde; Bxe_B0508, Bxe_B1017 Bxe_B1727, Bxe_2556 y Bxe_C1087 (**Figura 23**). Además, en el árbol generado a partir del alineamiento (**Figura 24**) el grupo de proteínas se localizó en la misma rama que la ArsC_{Trx} molde (pI258 Trx), indicando una probable relación. Posteriormente, con la finalidad de afinar más el análisis, se realizaron ediciones descartando las proteínas con menores porcentajes de identidad y mayores cambios identificados en el alineamiento, concluyendo con cinco posibles ArsC_{Trx}. En la tabla de identidades (**Figura 25A**) y el árbol generados a partir del alineamiento (**Figura 25B**), se observó que las cinco posibles ArsC_{Trx} presentaron porcentajes de identidad similares (22-25%) con la proteína molde; cabe señalar que las proteínas están indicadas en el genoma como Tirosina fosfatasa; sin embargo, ninguna ha sido caracterizada. Además, en el árbol del alineamiento todas surgen a partir de la misma rama que pI258 Trx, a excepción de Bxe_B1017.

Hasta este punto no fue posible descartar ninguna de las proteínas candidatas como ArsC_{Trx}, por lo cual se continuó con la elaboración de árboles filogenéticos, mediante los métodos Neighbor Joining y Mínima Evolución con Bootstrap 1000 (**Figura 26**), para establecer la probable relación evolutiva de dichas proteínas. Ambos árboles mostraron a Bxe_B1017 en la misma rama que pI258 Trx, mientras que Bxe_B0508 y Bxe_C1087, con las que anteriormente se obtuvieron los mayores porcentajes de identidad, se presentaron en ramas separadas indicando un grupo evolutivamente diferente (**Figura 26**). Debido a que los porcentajes de identidad obtenidos (**Figura 25A**) y las relaciones filogenéticas (**Figura 26**) difieren, se decidió realizar un análisis filogenético donde se incluyan ArsC de ambas familias caracterizadas con la finalidad de esclarecer si alguna de las proteínas en análisis presenta una relación evolutiva con una ArsC caracterizada.

1.2.3 ArsC_{Gfx/GSH} y ArsC_{Trx} de otras especies

En los análisis individuales de las familias ArsC surgieron proteínas adicionales a ArsC1 y ArsC2, candidatas a ser arsenato reductasas; sin embargo, la evidencia mostrada en los ensayos anteriores no fue suficiente para clasificarlas de tal manera. Por lo cual se decidió agrupar las proteínas identificadas y someterlas a un análisis filogenético con proteínas ArsC caracterizadas de ambas familias, lo que permitiría determinar la existencia de relaciones evolutivas que en los análisis anteriores no fueron percibidas al abordar a las familias por

		Percent Identity																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Divergence	1	█	11.7	9.5	9.1	9.8	16.8	9.1	14.0	5.8	10.4	11.3	13.4	13.0	11.2	9.5	14.5	9.2	7.9	13.7	9.5	6.1	1	Bxe_A0661
	2	430.0	█	6.6	9.3	8.9	10.5	9.4	9.7	3.2	8.9	13.1	5.4	13.0	6.9	10.3	11.1	9.6	14.1	13.8	5.9	7.0	2	Bxe_A0966
	3	553.0	1000.0	█	13.2	17.0	20.4	8.2	11.5	11.5	12.5	24.0	18.2	9.6	13.9	28.6	24.8	7.7	10.9	24.7	9.2	17.3	3	Bxe_A1551
	4	577.0	560.0	374.0	█	8.8	10.0	12.7	9.7	11.4	9.3	13.3	9.8	11.3	8.4	12.2	11.7	10.4	7.5	9.6	7.5	9.9	4	Bxe_A2085
	5	524.0	595.0	291.0	615.0	█	13.9	9.2	10.3	11.3	5.9	15.3	6.4	8.7	10.3	20.4	19.3	5.8	8.7	15.8	10.4	9.2	5	Bxe_A2212
	6	294.0	487.0	240.0	517.0	354.0	█	10.8	21.6	6.6	8.6	43.0	15.6	15.5	15.3	33.8	37.6	11.3	9.3	38.0	9.0	17.3	6	Bxe_A2244
	7	586.0	560.0	688.0	389.0	569.0	471.0	█	10.5	5.2	6.6	14.7	9.3	7.9	12.5	11.2	12.8	11.7	8.4	12.0	9.8	9.5	7	Bxe_A2415
	8	354.0	538.0	438.0	531.0	493.0	227.0	482.0	█	7.9	12.9	11.3	6.0	14.8	7.9	14.4	15.2	9.3	5.8	17.1	8.4	6.2	8	Bxe_A3829
	9	1000.0	1000.0	438.0	442.0	447.0	1000.0	1000.0	736.0	█	6.8	5.3	8.2	7.0	7.2	6.8	9.7	7.0	8.5	5.5	6.6	9.2	9	Bxe_A3861
	10	493.0	595.0	399.0	569.0	1000.0	637.0	1000.0	383.0	1000.0	█	10.2	11.5	7.0	11.0	9.0	13.4	9.7	7.2	15.4	10.2	7.1	10	Bxe_A4269
	11	442.0	377.0	204.0	371.0	321.0	100.9	337.0	442.0	1000.0	498.0	█	17.9	13.2	13.3	37.2	39.6	12.0	16.0	44.1	10.0	23.2	11	Bxe_B0508
	12	371.0	1000.0	270.0	531.0	1000.0	315.0	560.0	1000.0	688.0	434.0	274.0	█	10.4	15.0	13.4	17.9	12.8	9.4	14.9	7.6	20.2	12	Bxe_B1017
	13	380.0	380.0	545.0	442.0	626.0	319.0	736.0	335.0	1000.0	945.0	377.0	487.0	█	13.0	12.3	18.4	14.8	8.7	14.0	12.2	12.0	13	Bxe_B1468
	14	451.0	1000.0	354.0	661.0	493.0	323.0	399.0	719.0	907.0	456.0	374.0	330.0	380.0	█	12.6	11.3	9.2	10.6	11.3	8.0	9.4	14	Bxe_B1556
	15	545.0	493.0	169.5	407.0	240.0	138.5	451.0	344.0	1000.0	586.0	122.5	371.0	407.0	396.0	█	42.1	12.9	15.6	45.9	11.6	21.4	15	Bxe_B1727
	16	342.0	451.0	196.0	426.0	254.0	121.1	389.0	325.0	538.0	371.0	113.1	276.0	267.0	442.0	104.0	█	13.8	13.8	53.8	11.0	21.0	16	Bxe_B2256
	17	577.0	538.0	775.0	493.0	1000.0	442.0	430.0	569.0	1000.0	531.0	418.0	389.0	335.0	577.0	383.0	360.0	█	7.3	9.6	10.7	3.8	17	Bxe_C0128
	18	736.0	349.0	466.0	796.0	626.0	560.0	649.0	1000.0	637.0	874.0	309.0	553.0	626.0	482.0	315.0	360.0	874.0	█	13.0	8.6	9.2	18	Bxe_C0786
	19	362.0	360.0	198.0	545.0	313.0	119.2	418.0	287.0	1000.0	321.0	97.0	332.0	352.0	447.0	91.5	70.3	545.0	380.0	█	10.3	24.0	19	Bxe_C1087
	20	545.0	1000.0	577.0	819.0	487.0	586.0	524.0	661.0	1000.0	504.0	517.0	775.0	410.0	719.0	434.0	456.0	476.0	626.0	498.0	█	3.9	20	Bxe_C1245
	21	1000.0	945.0	284.0	517.0	577.0	284.0	545.0	1000.0	577.0	907.0	211.0	244.0	418.0	560.0	229.0	234.0	1000.0	577.0	204.0	1000.0	█	21	pl258 Trx

Figura 23. Búsqueda de proteínas ArsC_{Trx} de *B. xenovorans* LB400. Se indica la tabla de relaciones de identidad y divergencia del alineamiento múltiple de probables proteínas ArsC_{Trx}, en amarillo se indican los porcentajes más elevados obtenidos por parte de las probables proteínas ArsC_{Trx} adicionales (Bxe_B0508, 23.2%; Bxe_B1017, 20.2%; Bxe_B1727, 21.4%; Bxe_B2256, 21.0%; Bxe_C1087, 24.0%) con la ArsC_{Trx} pl258 molde (rosa). Alineamiento realizado mediante Clustal W.

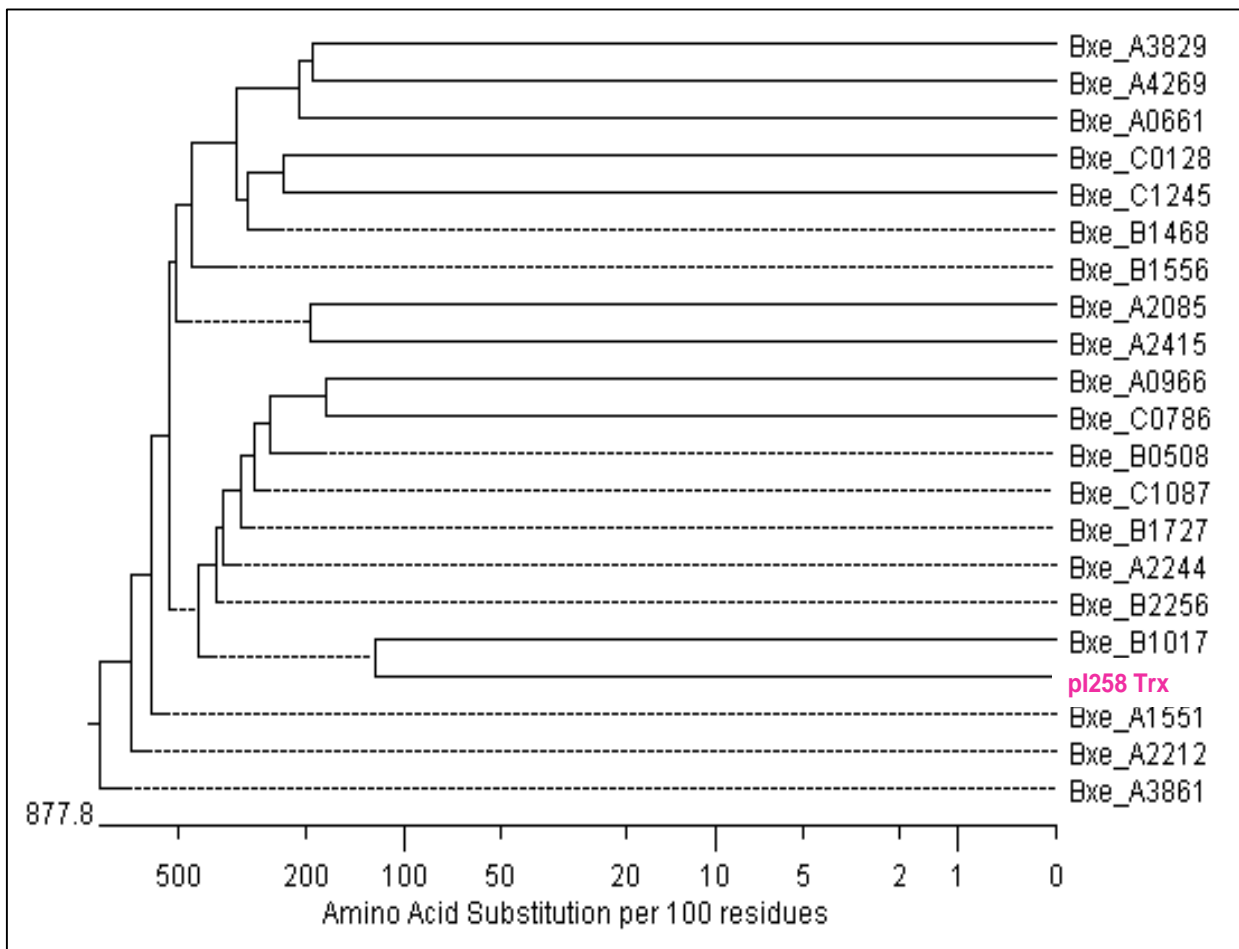


Figura 24. Selección de proteínas ArsC_{TRX} de *B. xenovorans* LB400. Se muestra el árbol del alineamiento múltiple de probables proteínas ArsC_{TRX}, se indica la proteína ArsC_{TRX} caracterizada en el plásmido pI258 de *S. aureus* (rosa) y las proteínas adicionales obtenidas en los análisis Blastp. Alineamiento realizado mediante Clustal W.

A)

		Percent Identity							
Divergence		1	2	3	4	5	6		
	1	█	19.0	37.0	39.3	43.8	24.8	1	Bxe_B0508 Tirosina fosfatasa
	2	258.0	█	16.0	21.1	16.8	22.9	2	Bxe_B1017 Tirosina fosfatasa
	3	123.6	309.0	█	42.1	45.9	22.3	3	Bxe_B1727 Tirosina fosfatasa
	4	114.1	232.0	104.0	█	53.8	23.4	4	Bxe_B2256 Tirosina fosfatasa
	5	98.0	294.0	91.5	70.3	█	25.6	5	Bxe_C1087 Tirosina fosfatasa
	6	196.0	213.0	219.0	209.0	193.1	█	6	pl258 Trx
	1	2	3	4	5	6			

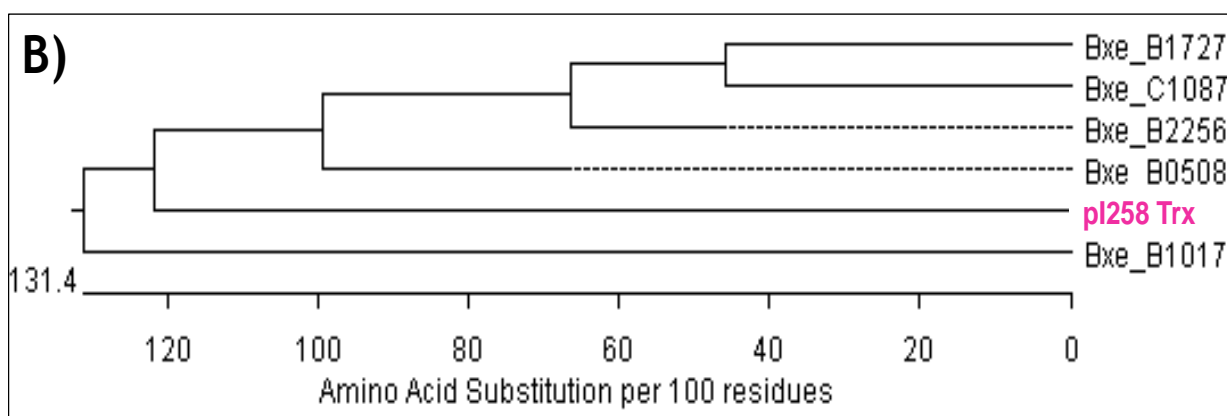


Figura 25. Búsqueda y selección de proteínas $ArsC_{Trx}$ de *B. xenovorans* LB400. A. Reporte de relaciones de identidad y divergencia del alineamiento múltiple; se indican en amarillo los porcentajes de identidad de las probables $ArsC_{Trx}$ (Bxe_B0508, 24.8%; Bxe_B1017, 22.9%; Bxe_B1727, 22.3%; Bxe_B2256, 23.4%; Bxe_C1087, 25.6%) con la proteína molde. Se señala la función predicha de las proteínas de *B. xenovorans* LB400. **B.** Árbol generado a partir del alineamiento. La proteína $ArsC_{Trx}$ caracterizada en el plásmido pI258 de *S. aureus* se señala en rosa. Las líneas discontinuas indican los gaps insertados por cada 100 aminoácidos sustituidos. Alineamiento realizado mediante Clustal W.

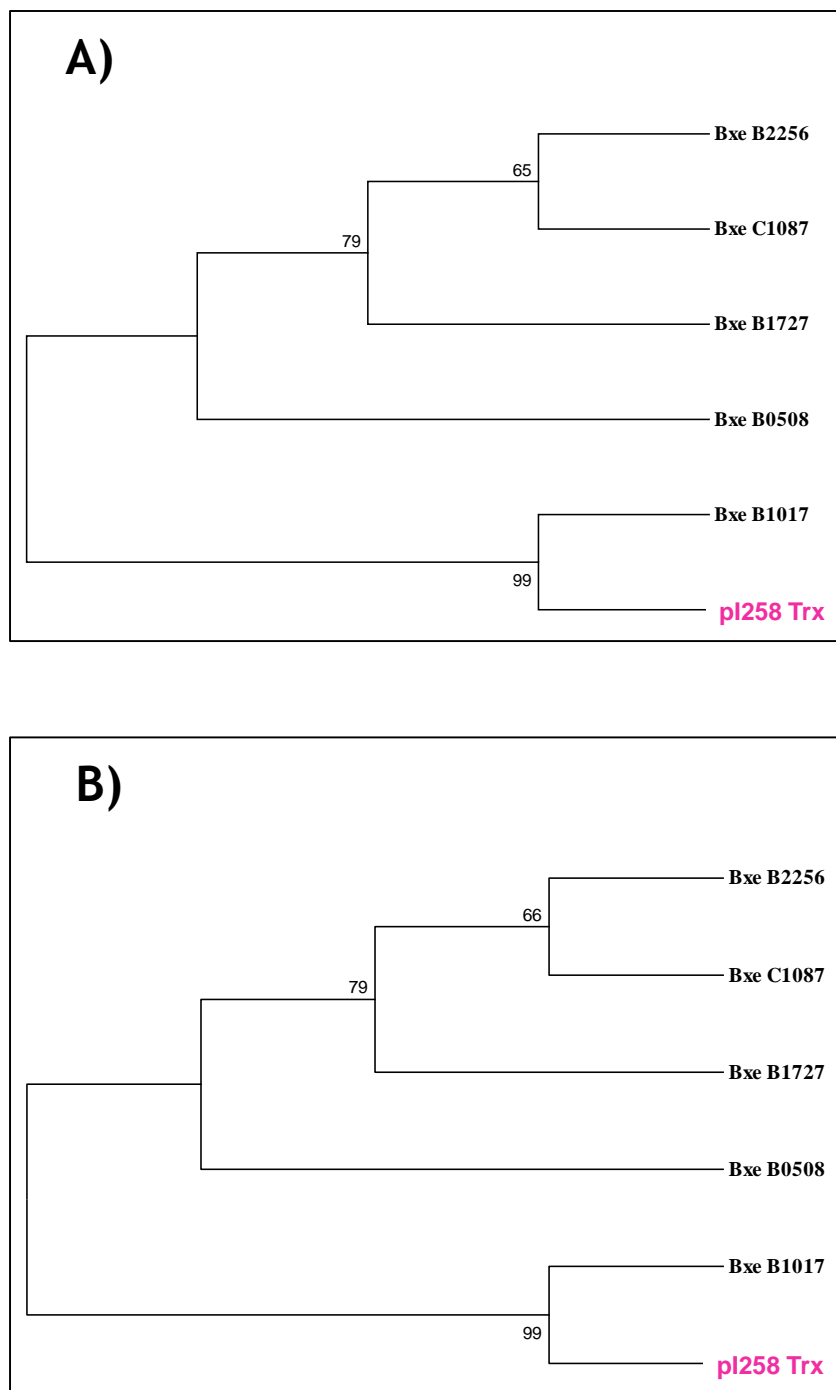


Figura 26. Relaciones filogenéticas de proteínas $ArsC_{Trx}$ de *B. xenovorans* LB400. Se muestran los árboles filogenéticos de las probables proteínas $ArsC_{Trx}$, donde se indica la proteína $ArsC_{Trx}$ caracterizada en el plásmido pI258 de *S. aureus* (rosa) y las proteínas adicionales obtenidas en los análisis Blastp. **A.** Neighbor Joining. **B.** Mínima Evolución. Bootstrap 1000.

separado. Se elaboraron árboles mediante los métodos utilizados anteriormente; en ambos casos claramente se distinguen las familias de Arsenato reductasas; las ArsC_{TRX}, se localizaron en la parte superior mientras que las ArsC_{GRX/GSH} se presentaron en la parte inferior del árbol. ArsC1 y ArsC2 se ubicaron junto con las ArsC_{GRX/GSH} y en el caso de las proteínas adicionales de LB400, dos se muestran como grupos externos, al localizarse fuera de ambas familias, seis se agrupan entre ellas en un rama localizadas en el grupo de las ArsC_{TRX}, mientras que las dos restantes, Bxe_A1669 y Bxe_B1017, se localizaron en ramas compartidas con ArsC caracterizadas en otras especies (**Figura 27**).

Bxe_A1669 se agrupó con ArsC_{GRX/GSH} de *Salmonella enterica* y *Neisseria gonorrhoeae*, presentando un porcentaje de identidad de 43.1% y 45.2%, respectivamente. Por otra parte, Bxe_B1017, se agrupó con las ArsC_{TRX} de *P. aeruginosa* PAO1 y *A. ferrooxidans* ATCC 23270, con las cuales presentó un porcentaje de identidad de 32.9% y 27.8%, respectivamente (**Figura 28**).

En el análisis de las arsenato reductasas se concluye que existen cuatro probables ArsC en LB400: tres ArsC_{GRX/GSH}, ArsC1, ArsC2 y Bxe_A1669, y una probable ArsC_{TRX}, Bxe_B1017.

Se concluye que LB400 cuenta con dos probables transportadores de As(III) y cuatro As(V) reductasas, teniendo un gen de cada tipo formando parte del operón *arsRacr3CH*. A partir de ahora, los probables transportadores de As(III) y las As(V) reductasas de LB400 serán nombradas como se indica en la **Tabla 9**.

2. Establecer la participación de los genes *arsB* y *arsC* de LB400 en la resistencia a arsenato y arsenito

❖ Susceptibilidad a Arsénico de cepas mutantes de *E. coli* afectadas en genes *ars*

Teóricamente era probable predecir el fenotipo de las mutantes de *E. coli* afectadas en genes *ars* al tener en cuenta el gen eliminado o interrumpido en cada caso; sin embargo, al ser las cepas que posteriormente se utilizarían como receptoras de los genes asociados a la resistencia a As de LB400, era necesario tener el resultado experimental de dichos fenotipos, por lo cual se realizaron ensayos de susceptibilidad a As(V) y As(III).

En las mutantes interrumpidas en genes únicos se obtuvo que, para ambas especies de As, la mutante JW3469-1 tuvo un crecimiento mucho menor comparado con la cepa silvestre BW25113 (**Figura 29**), y la mutante JW3470-1 presentó un crecimiento menor que la cepa silvestre en el medio con As(V) (**Figura 29A**) mientras que en el medio con As(III) creció de forma similar al control (**Figura 29B**). En el caso de la mutante que presenta deletado el operón *ars*, AW3110, ésta mostró un crecimiento menor con ambas especies de As, en comparación con la cepa silvestre (W3110) (**Figura 30**). Los fenotipos de las cepas mutantes se resumen en la **Tabla 10** y concuerdan con la información teórica sobre el papel que juega cada gen en la resistencia a As(V) y As(III).

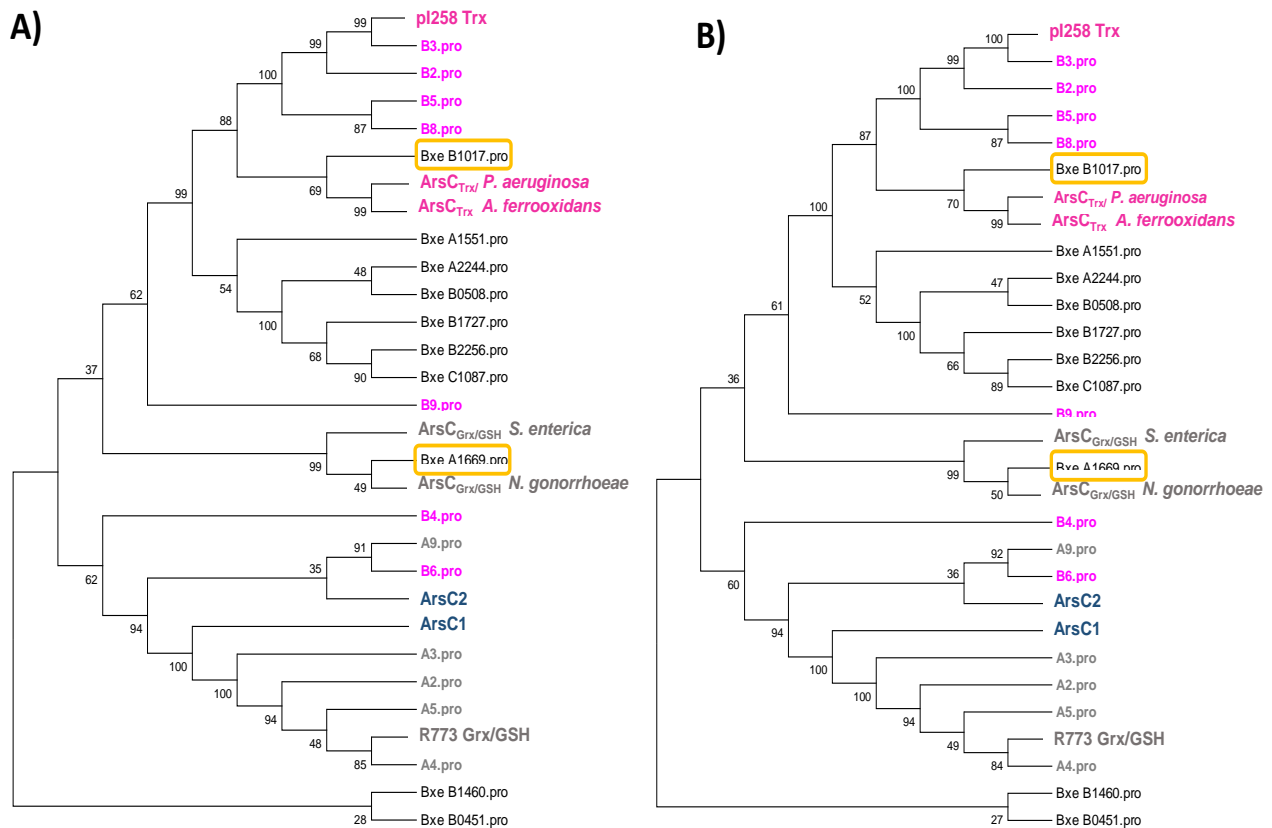


Figura 27. Relaciones filogenéticas de proteínas ArsC de *B. xenovorans* LB400. Se muestran los árboles filogenéticos de las probables proteínas ArsC, donde se indican las proteínas ArsC caracterizadas en otras especies, en gris la familia ArsC_{Grx/GSH} y en rosa la familia ArsC_{Trx}, en azul las proteínas ArsC1 y ArsC2 señaladas en el genoma de *B. xenovorans* LB400 y en negro las proteínas adicionales obtenidas en los análisis Blastp. Se encierra en amarillo proteínas de *B. xenovorans* LB400 que presentan relación evolutiva con las ArsC caracterizadas, adicionales a ArsC1 y ArsC2. **A.** Neighbor Joining. **B.** Mínima Evolución. Bootstrap 1000.

		Percent Identity																																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30			
Divergence	1	█	92.2	84.4	95.0	94.3	65.7	18.0	40.9	40.9	19.1	17.4	16.5	9.2	5.6	6.4	5.6	8.3	8.0	9.5	8.0	7.9	8.6	9.8	3.6	7.5	9.4	15.9	19.5	41.0	7.4	1	R773 Grx/GSH	
	2	8.3	█	85.1	92.2	90.8	66.4	19.4	42.6	40.9	20.0	18.3	16.5	9.2	5.6	6.4	5.6	8.3	8.0	9.5	7.3	7.9	9.4	8.3	3.6	7.5	10.1	17.1	22.0	42.7	7.4	2	A2	
	3	17.5	16.6	█	85.8	85.1	64.3	17.3	40.0	42.6	20.9	17.4	17.4	10.6	5.6	5.6	5.6	9.0	8.0	9.5	8.8	7.9	8.6	9.8	5.0	8.2	9.4	12.2	19.5	42.7	8.1	3	A3	
	4	5.1	8.3	15.8	█	94.3	66.4	18.7	39.1	41.7	19.1	17.4	16.5	8.5	5.6	6.4	5.6	8.3	8.8	10.2	9.5	8.6	9.4	9.8	4.3	7.5	10.1	15.9	19.5	41.9	7.4	4	A4	
	5	5.9	9.9	16.6	5.9	█	67.1	17.3	40.0	41.7	19.1	18.3	15.7	9.2	4.8	5.6	4.8	7.5	7.3	8.8	6.6	7.9	9.4	9.0	4.3	6.7	8.6	14.6	19.5	41.9	7.4	5	A5	
	6	45.6	44.4	48.2	44.4	43.1	█	18.8	42.6	40.4	21.9	18.4	17.5	7.9	4.8	5.6	4.8	6.1	5.1	5.1	8.8	10.1	9.4	7.6	5.8	6.8	8.7	17.3	19.7	38.8	10.3	6	ArsC1	
	7	274.0	253.0	285.0	262.0	285.0	261.0	█	19.5	19.5	21.6	16.4	18.2	14.3	7.3	6.5	7.3	8.4	10.9	5.8	5.1	7.4	7.5	8.4	10.9	5.9	7.1	14.6	20.7	23.5	7.8	7	Bxe_B1460	
	8	108.2	102.1	111.5	114.8	111.5	102.1	253.0	█	38.9	18.0	15.0	22.5	10.3	7.4	7.4	7.4	14.0	11.4	9.6	11.4	6.9	7.9	10.5	7.9	9.6	13.2	18.5	22.8	52.2	8.8	8	A9	
	9	108.2	108.2	102.1	105.1	105.1	110.2	253.0	115.6	█	15.9	22.1	17.7	10.9	8.3	8.3	8.3	11.4	14.2	12.4	12.4	10.9	14.0	10.5	9.6	11.1	11.5	14.8	25.4	42.6	13.2	9	ArsC2	
	10	257.0	246.0	236.0	257.0	257.0	223.0	228.0	273.0	309.0	█	43.1	36.8	6.8	11.2	11.2	11.2	11.5	12.4	9.7	8.8	9.5	9.7	14.2	10.3	8.7	5.3	22.2	22.1	22.1	7.1	10	ArsC _{Grx/GSH} <i>S. enterica</i>	
	11	284.0	270.0	284.0	284.0	270.0	267.0	301.0	328.0	221.0	100.4	█	45.2	10.7	10.1	10.1	10.1	12.2	12.4	10.5	6.1	8.5	9.6	12.2	12.6	7.8	10.5	20.7	25.4	18.3	8.8	11	Bxe_A1669	
	12	298.0	298.0	284.0	298.0	313.0	282.0	271.0	217.0	279.0	124.6	93.6	█	12.1	8.8	8.8	8.8	9.2	8.4	8.4	10.1	6.6	8.4	10.9	5.7	7.5	7.6	18.5	16.8	24.8	9.2	12	ArsC _{Grx/GSH} <i>N. gonorrhoeae</i>	
	13	569.0	569.0	476.0	637.0	569.0	736.0	347.0	493.0	461.0	1000.0	471.0	414.0	█	9.9	9.9	9.9	8.6	6.2	4.8	6.1	5.5	11.7	8.6	7.0	6.0	6.7	13.4	10.3	13.7	10.9	13	Bxe_B0451	
	14	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	845.0	819.0	661.0	447.0	511.0	605.0	517.0	█	94.7	100.0	62.6	21.1	24.0	20.8	20.6	30.0	66.4	26.0	15.4	20.9	8.8	2.5	9.2	27.3	14	pl258 Trx	
	15	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	819.0	661.0	447.0	511.0	605.0	517.0	5.6	█	94.7	61.1	21.1	24.8	20.8	21.4	30.0	64.1	26.0	16.2	21.7	7.5	2.5	9.2	27.3	15	B2		
	16	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	845.0	819.0	661.0	447.0	511.0	605.0	517.0	0.0	5.6	█	62.6	21.1	24.0	20.8	20.6	30.0	66.4	26.0	15.4	20.9	8.8	2.5	9.2	27.3	16	B3	
	17	675.0	675.0	586.0	675.0	796.0	1000.0	661.0	352.0	438.0	434.0	410.0	569.0	626.0	51.4	54.4	51.4	█	22.8	23.4	21.0	18.0	32.6	77.7	28.3	16.7	20.4	6.2	6.5	15.7	27.9	17	B5	
	18	703.0	703.0	703.0	615.0	874.0	1000.0	461.0	438.0	349.0	403.0	403.0	649.0	1000.0	233.0	233.0	215.0	█	53.8	42.1	25.5	15.7	22.8	18.6	37.6	39.3	13.8	7.4	13.9	16.8	18	Bxe_B2256		
	19	553.0	553.0	498.0	615.0	1000.0	1000.0	538.0	403.0	531.0	482.0	649.0	1000.0	203.0	196.0	203.0	209.0	70.3	█	45.9	24.7	17.0	24.1	17.0	38.0	43.8	12.5	5.7	15.7	17.4	19	Bxe_C1087		
	20	703.0	874.0	615.0	553.0	1000.0	605.0	1000.0	438.0	403.0	605.0	1000.0	511.0	1000.0	237.0	237.0	237.0	233.0	104.0	91.5	█	27.2	17.6	22.5	16.2	33.8	37.0	13.8	4.9	8.7	16.5	20	Bxe_B1727	
	21	736.0	736.0	736.0	637.0	736.0	511.0	845.0	1000.0	461.0	553.0	649.0	1000.0	000.0	238.0	230.0	238.0	274.0	193.6	198.0	179.5	█	19.3	18.7	18.5	20.4	23.1	12.2	6.3	6.8	16.9	21	A1551	
	22	626.0	560.0	626.0	560.0	553.0	796.0	736.0	352.0	531.0	545.0	649.0	430.0	159.9	159.9	159.9	144.7	313.0	289.0	279.0	254.0	█	31.2	27.8	17.4	14.5	8.8	3.2	13.9	54.2	22	ArsC _{Trx} <i>A. ferrooxidans</i>		
	23	531.0	675.0	531.0	531.0	586.0	796.0	661.0	482.0	482.0	349.0	410.0	461.0	626.0	44.4	48.5	44.4	26.5	215.0	203.0	218.0	262.0	152.9	█	26.1	15.2	20.4	10.0	5.6	13.0	27.9	23	B8	
	24	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	466.0	736.0	538.0	493.0	393.0	1000.0	1000.0	189.8	189.8	189.8	171.7	265.0	289.0	305.0	267.0	175.2	188.6	█	17.3	20.7	8.6	6.5	10.4	32.9	24	Bxe_B1017	
	25	819.0	819.0	675.0	819.0	1000.0	1000.0	0545.0	451.0	626.0	754.0	819.0	1000.0	321.0	305.0	321.0	296.0	121.1	119.2	138.5	240.0	284.0	323.0	285.0	█	43.0	12.3	6.4	11.2	22.1	25	Bxe_A2244		
	26	560.0	511.0	560.0	511.0	626.0	626.0	945.0	377.0	434.0	1000.0	482.0	796.0	1000.0	234.0	226.0	234.0	240.0	114.1	98.0	123.6	211.0	342.0	240.0	238.0	100.9	█	10.0	5.7	14.8	15.6	26	Bxe_B0508	
	27	311.0	289.0	410.0	311.0	337.0	285.0	337.0	265.0	332.0	220.0	237.0	265.0	368.0	615.0	819.0	615.0	1000.0	360.0	399.0	360.0	410.0	615.0	517.0	626.0	403.0	517.0	█	10.0	14.6	7.6	27	B9	
	28	252.0	223.0	252.0	252.0	252.0	250.0	238.0	214.0	194.4	221.0	194.4	292.0	493.0	1000.0	1000.0	1000.0	845.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	1000.0	28	B4
	29	107.7	101.7	101.7	104.6	104.6	116.2	209.0	74.2	102.1	221.0	270.0	197.0	362.0	577.0	577.0	577.0	315.0	354.0	315.0	626.0	1000.0	354.0	380.0	487.0	447.0	335.0	337.0	196.4	█	11.5	29	A8	
	30	845.0	845.0	703.0	845.0	845.0	498.0	736.0	605.0	377.0	945.0	605.0	569.0	466.0	178.5	178.5	178.5	174.0	294.0	284.0	298.0	291.0	69.3	174.0	143.1	222.0	315.0	796.0	1000.0	434.0	█	30	ArsC _{Trx} <i>P. aeruginosa</i>	

Figura 28. Búsqueda de proteínas ArsC de *B. xenovorans* LB400. Se indican las secuencias de ArsC caracterizadas en otras especies y de las probables proteínas ArsC de *B. xenovorans* LB400 a comparar, señalando en rosa ArsC_{Trx} (ArsC de pl258, *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y *P. aeruginosa* PAO1), en gris a ArsC_{Grx/GSH} (ArsC de R773, *S. enterica* y *N. gonorrhoeae*) y en azul a las ArsC indicadas en *B. xenovorans* LB400. Se señalan los porcentajes de identidad relevantes de ArsC1 (65.7%) y ArsC2 (40.9%) con ArsC_{Grx/GSH} de R773, Bxe_A1669 (43.1 y 45.2%) con ArsC_{Grx/GSH} de *S. enterica* y *N. gonorrhoeae*, y Bxe_B1017 (27.8 y 32.9%) con ArsC_{Trx} de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y *P. aeruginosa* PAO1.

Tabla 9. Probables transportadores de As(III) y As(V) reductasas identificadas en el análisis filogenético de *B. xenovorans* LB400.

	Gen	Proteína	Función
Operón <i>arsRacr3C₂H</i>	<i>Bxe_B0303</i>	Acr3	Transportadores de arsenito
	<i>Bxe_B2062</i>	ArsB	
	<i>Bxe_A1669</i>	ArsC1	Arsenato reductasas
	<i>Bxe_B0302</i>	ArsC2	
	<i>Bxe_B1017</i>	ArsC3	
	<i>Bxe_B3030</i>	ArsC4	

Se señalan en verde los genes que forman parte del operón *arsR₃acr3C₂H* de *B. xenovorans* LB400 y las probables proteínas que codifican.

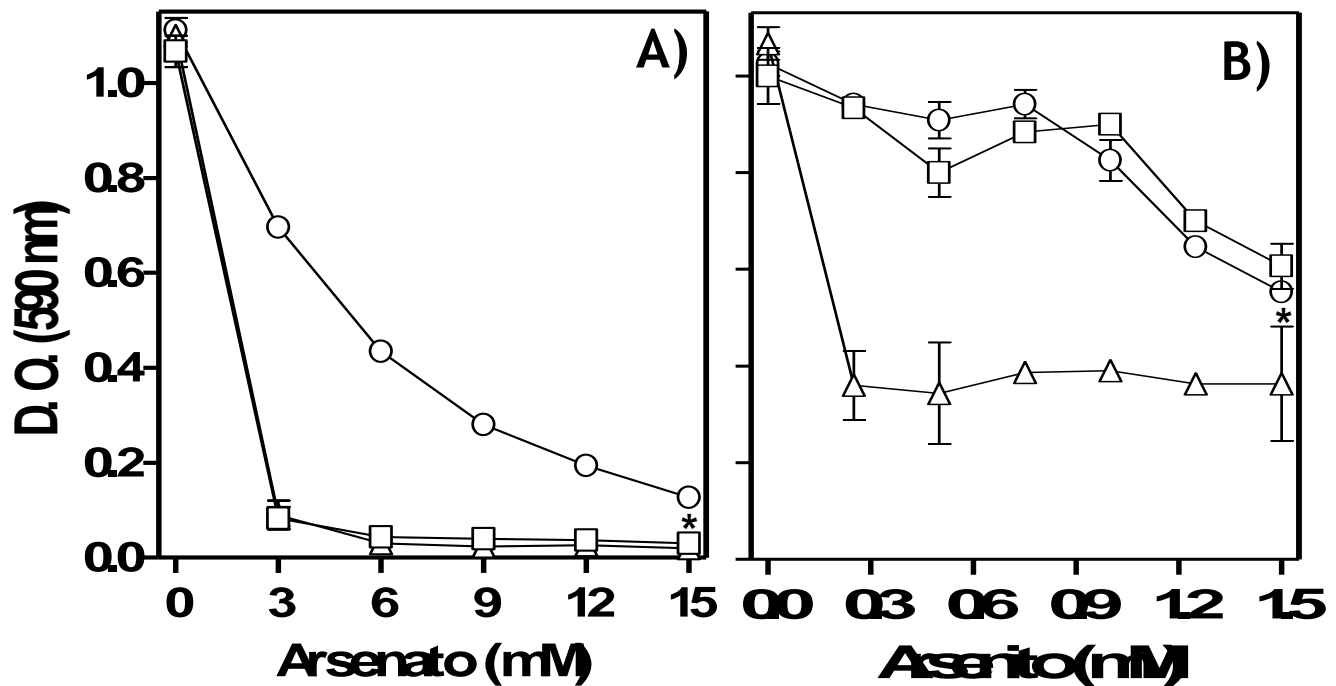


Figura 29. Susceptibilidad a Arsénico de las mutantes de *E. coli* interrumpidas en genes únicos. Los cultivos se crecieron en caldo nutritivo (CN) por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó **A.** arsenato de sodio [As(V)] o **B.** arsenito de sodio [As(III)] a las concentraciones indicadas. Para ambos casos, BW25113 (O), JW3469-1 (Δ) y JW3470-1 (□). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a BW25113 ($p < 0.05$), $n = 3$.

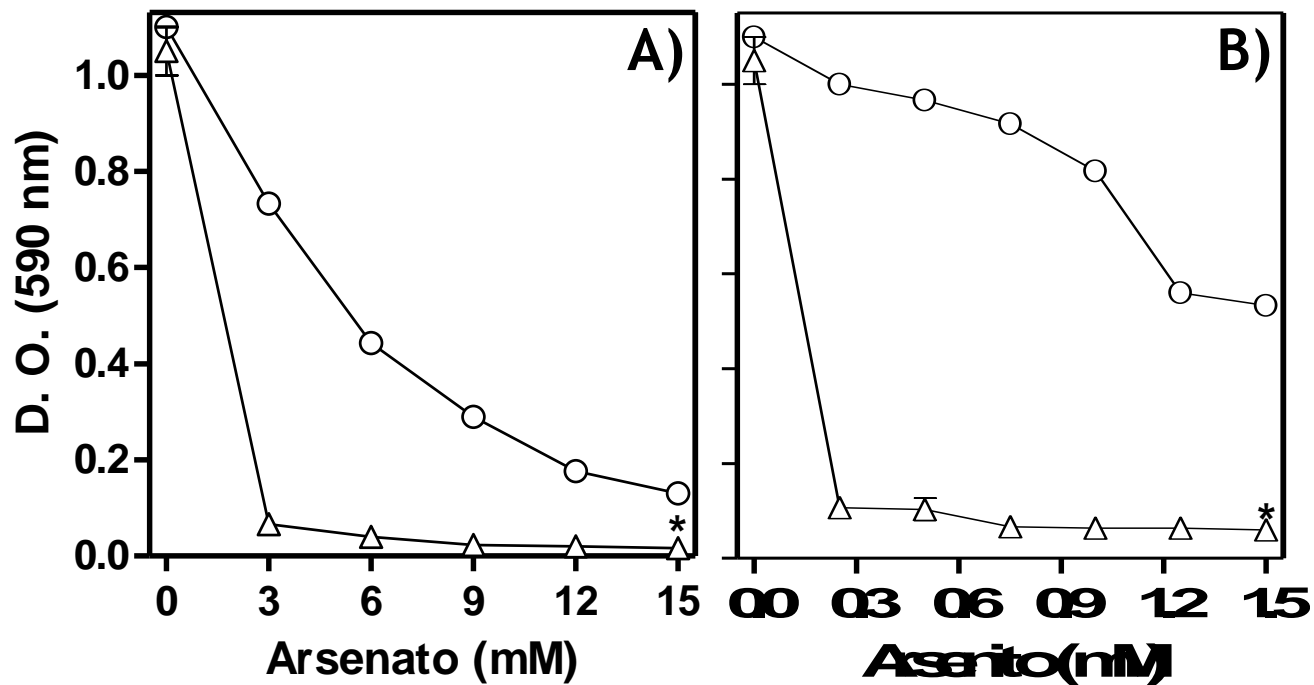


Figura 30. Susceptibilidad a Arsénico de la mutante *E. coli* AW3110. Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó **A.** As(V) o **B.** As(III) a las concentraciones indicadas. Para ambos casos, W3110 (O) y AW3110 (Δ). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a W3110 ($p < 0.05$), $n=3$.

Tabla 10. Fenotipos de cepas de *E. coli*

Cepa	Genotipo	Fenotipos*	
		As(V)	As(III)
BW25113 W3110	<i>arsRBC</i>	R	R
JW3469-1	<i>arsB::Km</i>	S	S
JW3470-1	<i>arsC::Km</i>	S	R
AW3110	Δ <i>arsRBC</i>	S	HS

* R, resistente; S, sensible; HS, hipersensible

2.1 Participación del operón *arsRacrCH* en la resistencia a As de LB400

En el laboratorio se contaba con la construcción pUC_arsRacrCH (Salgado-Lora, 2017) (**Figura 31A**); ésta fue transferida y caracterizada en las cepas AW3110, JW3470-1 y PAO1 (**Figura 31B**), para posteriormente realizar los ensayos de susceptibilidad a As(V) y As(III).

2.1.1 Susceptibilidad a As de las transformantes con el operón *arsRacrCH*

Con el propósito de evaluar si el operón *arsRacrCH* de LB400 es funcional en la resistencia a As, se realizaron ensayos de susceptibilidad de las cepas transformadas a los oxianiones de As, empleando arsenato de sodio [As(V)], para evaluar a *arsC₂*, y arsenito de sodio [As(III)], para evaluar al transportador *acr3*. Se utilizaron como controles resistentes a las cepas W3110(pUCP20), en el caso de AW3110, BW25113(pUCP20), en el caso de la mutante JW3470-1, y como control sensible a la mutante correspondiente. Obteniendo los siguientes resultados:

- *E. coli* AW3110 (pUC_arsRacrCH)

En el ensayo realizado con AW3110 (pUC_arsRacrCH) en un medio con As(V), la cepa presentó un crecimiento ligeramente mayor comparado con la mutante AW3110 pero bajo comparado con la cepa silvestre (**Figura 32A**). En el medio con As(III) (**Figura 32B**), AW3110 (pUC_arsRacrCH) presentó un crecimiento claramente mayor comparado con la cepa mutante; sin embargo, la cepa silvestre W3110 siguió teniendo mayor resistencia. Lo cual significa que el gen *acr3* del operón es funcional al conferir resistencia a As(III), aunque no con la misma eficiencia que el *arsB* de la cepa silvestre (**Figura 32A**). Por otro lado, *arsC₂* confirió una ligera resistencia a As(V) comparado con la *arsC* de W3110 (**Figura 32B**); por esta razón se decidió transferir el operón a la mutante JW3470-1 afectada en *arsC*, en espera de observar un fenotipo más claro.

- *E. coli* JW3470-1 (pUC_arsRacrCH)

La proteína ArsC realiza su función en presencia de As(V), mientras que en As(III) su presencia o ausencia no se relacionará con el fenotipo de resistencia a dicho compuesto, por lo cual para evaluar la participación de ArsC₂ en la resistencia a As, únicamente se muestran los ensayos realizados en un medio con As(V).

En el ensayo de susceptibilidad realizado, se observa que la cepa JW3470-1 (pUC_arsRacrCH) presentó un crecimiento similar a JW3470-1, teniendo ambas un fenotipo de sensibilidad a As(V) (**Figura 33A**); debido a que ya se había hecho uso de dos cepas de *E. coli* y que en ninguna se pudo esclarecer la participación de ArsC₂, se decidió utilizar una bacteria filogenéticamente más cercana a *B. xenovorans*, eligiendo a *P. aeruginosa* PAO1.

- *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_arsRacrCH)

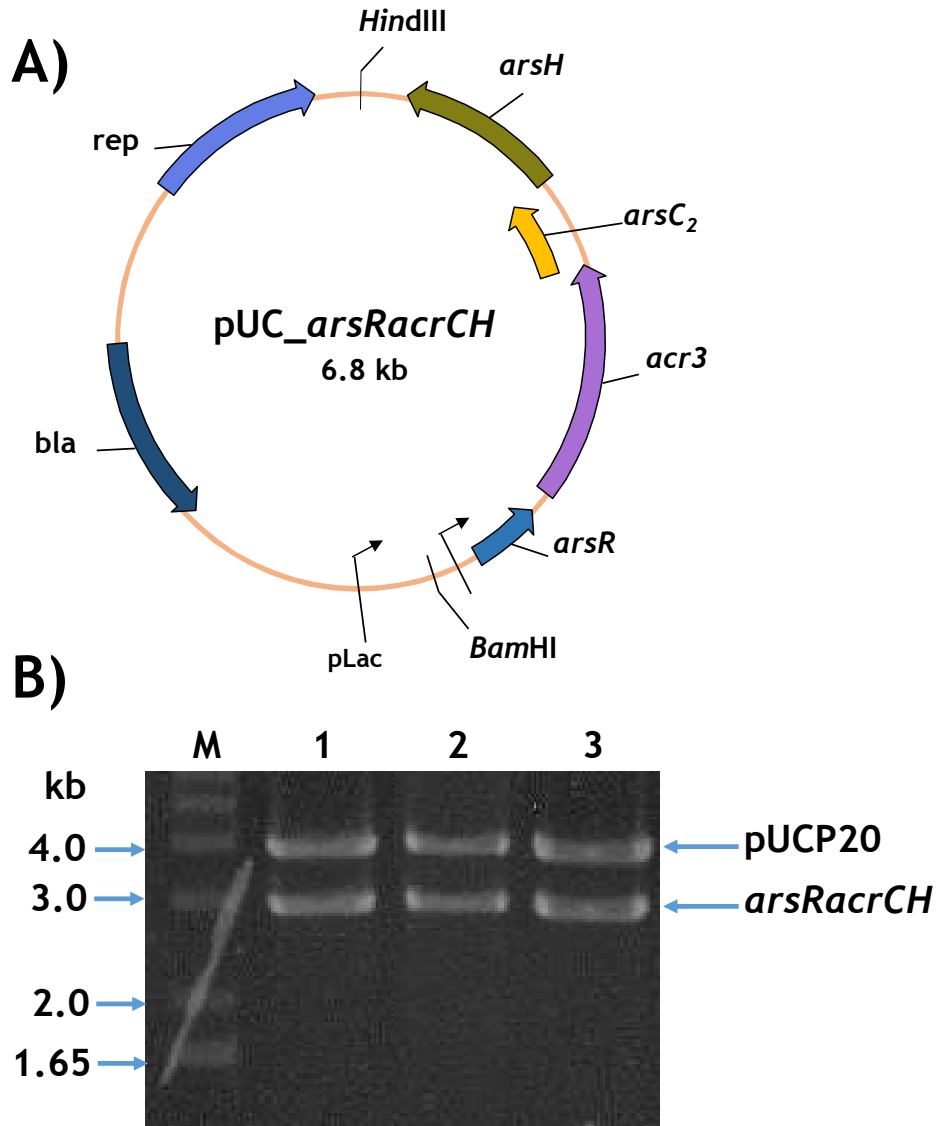


Figura 31. Caracterización del plásmido pUC_arsRacrCH en *E. coli* y *P. aeruginosa*. A. Mapa genético del plásmido pUC_arsRacrCH. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción BamHI y HindIII. B. Gel de agarosa donde se muestra el producto de la restricción enzimática. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; 1-3, producto de restricción con las enzimas BamHI/HindIII de las cepas con el plásmido: 1. *E. coli* AW3110, 2. JW3470-1 y 3. PAO1; en el lado derecho se señalan las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 2.90 (arsRacrCH) y 3.90 kb (pUCP20).

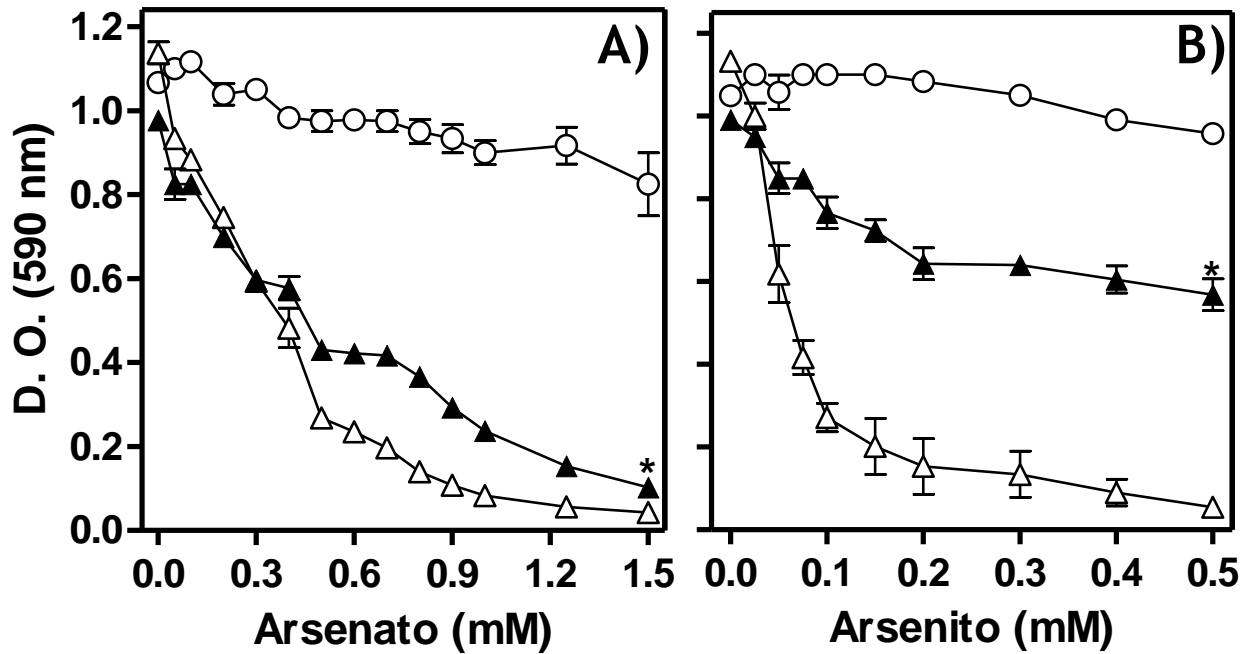


Figura 32. Susceptibilidad a Arsénico de *E. coli* AW3110 (pUC_arsRacrCH). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó **A.** As(V) y **B.** As(III) a las concentraciones indicadas. Para ambos casos, W3110(pUCP20) (O), AW3110 (Δ) y AW3110 (pUC_arsRacrCH) (▲). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a AW3110 ($p < 0.05$), $n=3$.

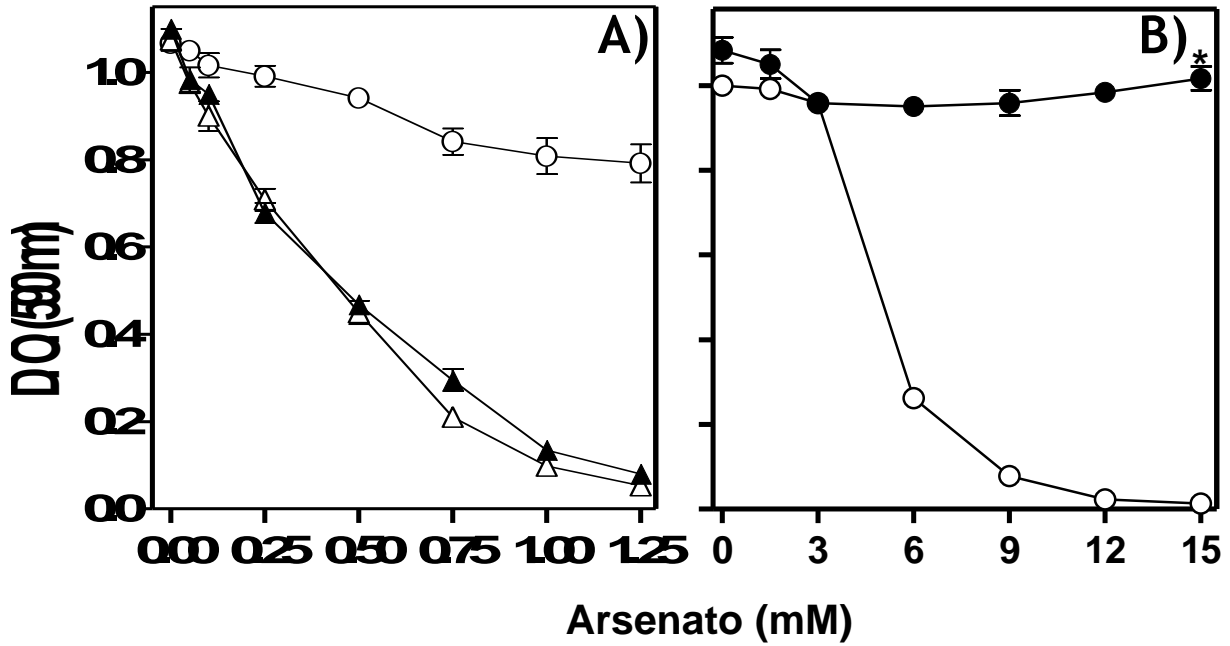


Figura 33. Susceptibilidad a As(V) de *E. coli* JW3470-1 (pUC_arsRacrCH) y *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_arsRacrCH). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó As(V) a las concentraciones indicadas. Donde **A.** BW25113(pUCP20) (O), JW3470-1 (Δ) y JW3470-1 (pUC_arsRacrCH) (▲) y **B.** *P. aeruginosa* PAO1(pUCP20) (O) y PAO1(pUC_arsRacrCH) (●). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a PAO1(pUCP20) (p<0.05), n=3.

En el ensayo de susceptibilidad a As(V), PAO1 (pUC_arsRacrCH) presentó un crecimiento claramente mayor comparado al control sensible, PAO1(pUCP20) (**Figura 33B**).

En el análisis del operón *arsRacrCH* se concluye que los genes *acr3* y *arsC₂* de LB400 son funcionales confiriendo resistencia a As.

❖ Susceptibilidad a As de las transformantes con los genes *arsB*, *arsC₁*, *arsC₃* y *arsC₄*.

Para determinar la participación de los genes *ars* que no forman parte del operón *arsRacrCH* de LB400 en la resistencia a As(V) y As(III), fue necesario evaluar a los genes de forma individual, por lo cual primeramente se realizó la amplificación mediante PCR de los genes *arsB*, *arsC₁*, *arsC₃* y *arsC₄*, utilizando los oligonucleótidos y las condiciones específicas para cada gen (**Tabla 4 y 6**); posteriormente los genes se clonaron en el vector pJET 1.2/blunt y se transfirieron a la cepa *E. coli* JM101, donde se realizó la caracterización de cada plásmido recombinante mediante las enzimas de restricción correspondientes a cada construcción (**Tabla 4**). Con el objetivo de determinar la funcionalidad de los genes *ars* de LB400 en *E. coli* JM101, se realizó la subclonación de los genes mencionados anteriormente en el vector de expresión pUCP20. Para ello se realizó la digestión de los plásmidos recombinantes con las enzimas correspondientes (**Tabla 4**), liberando los insertos para de esta manera dirigir la ligación de los genes en el vector pUCP20 de acuerdo al procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Obtenidos los plásmidos recombinantes, posteriormente fueron transferidos a células competentes de *E. coli* JM101, donde se caracterizaron con las enzimas específicas para cada gen (**Tabla 4**), originando los fragmentos de restricción esperados. Finalmente los plásmidos recombinantes fueron transferidos a las cepas necesarias, donde se realizaron ensayos de susceptibilidad a As, para determinar su participación en la resistencia al metaloide.

2.2 Participación del gen *arsB* en la resistencia a As de LB400

Los plásmidos recombinantes pJET_arsB (**Figura 34A**) y pUC_arsB (**Figura 35A**), presentaron los fragmentos esperados de aproximadamente 2.24 y 2.60 kb, y 2.24 y 3.89 kb, respectivamente (**Figura 34C y 35B**).

2.2.1 Susceptibilidad a As de las transformantes con el gen *arsB*

Los ensayos fueron realizados en un medio con As(III) en las cepas AW3110 (pUC_arsB) y JW3469-1 (pUC_arsB), obteniendo lo siguiente:

- *E. coli* AW3110 (pUC_arsB)

AW3110 (pUC_arsB) presentó un crecimiento mayor comparado con la mutante AW3110, indicando un fenotipo de resistencia a As(III); sin embargo, la cepa silvestre W3110 siguió presentando un mayor crecimiento (**Figura 36**).

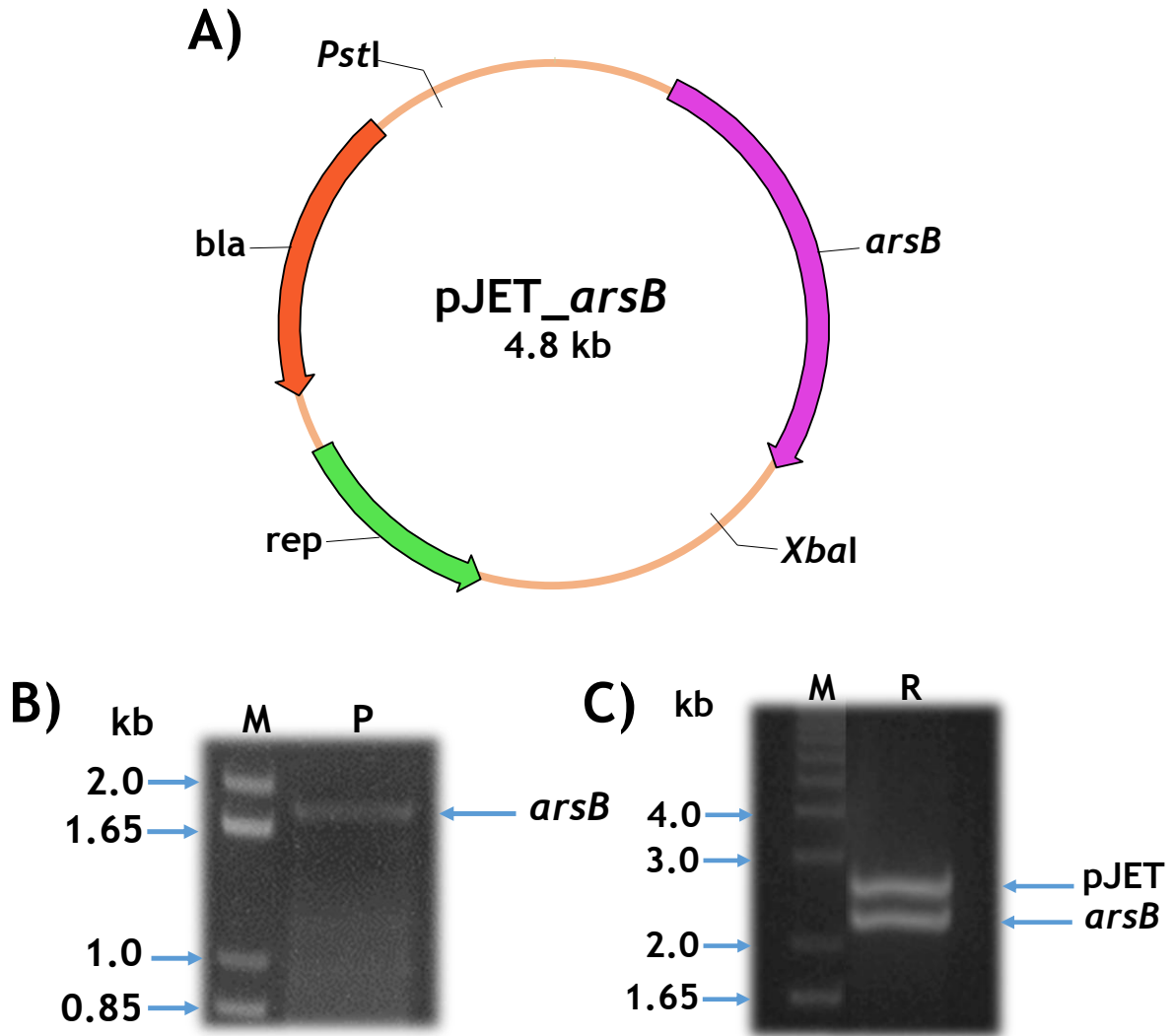


Figura 34. Clonación de *arsB* en el vector pJET 1.2/Blunt. A. Mapa genético del plásmido pJET_arsB. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *PstI* y *XbaI*. B. Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR de *arsB*. C. Digestión enzimática del plásmido pJET_arsB. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; P, producto de PCR de *arsB* (1.8 kb); R, producto de digestión con las enzimas *PstI/XbaI*; en el lado derecho se señalan las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 2.24 (*arsB*) y 2.60 kb (pJET).

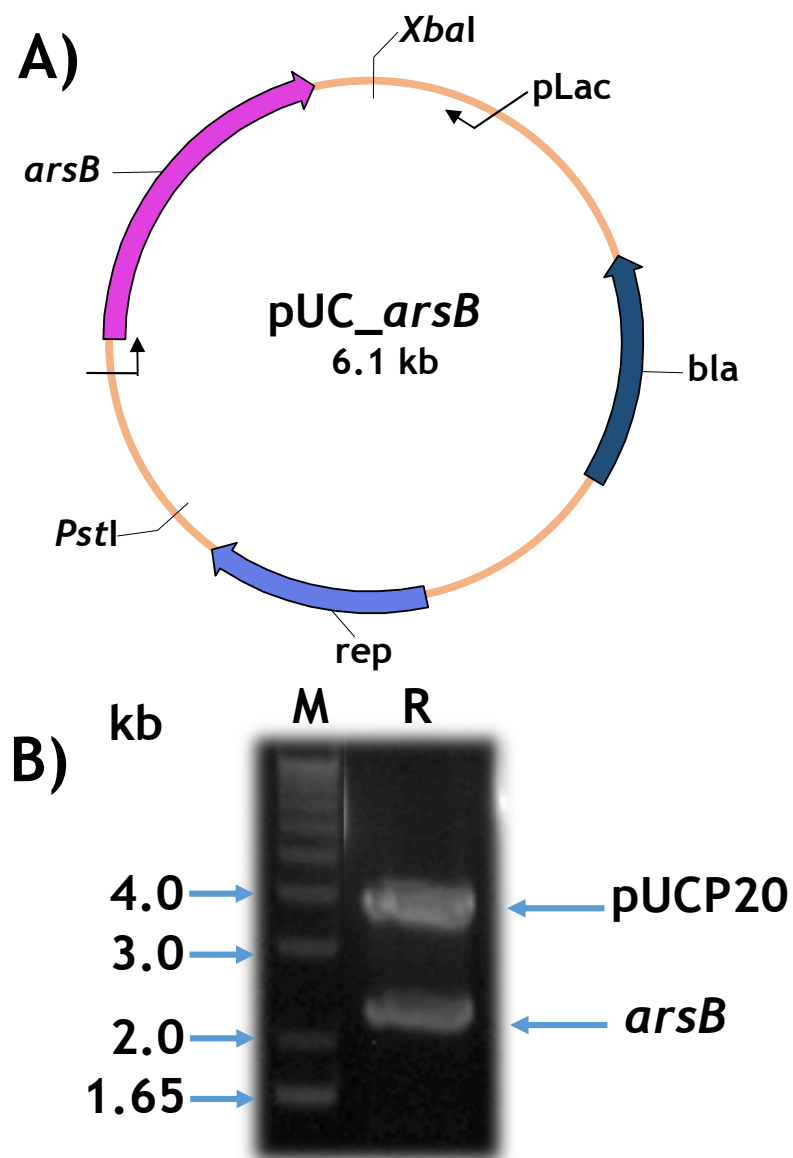


Figura 35. Subclonación de *arsB* en el vector pUCP20. A. Mapa genético del plásmido pUC_arsB. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *PstI* y *XbaI*. B. Gel de agarosa donde se muestra el producto de la restricción enzimática. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; R, producto de restricción con las enzimas *PstI* y *XbaI*; en el lado derecho se señalan las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 2.24 (*arsB*) y 3.89 kb (pUCP20).

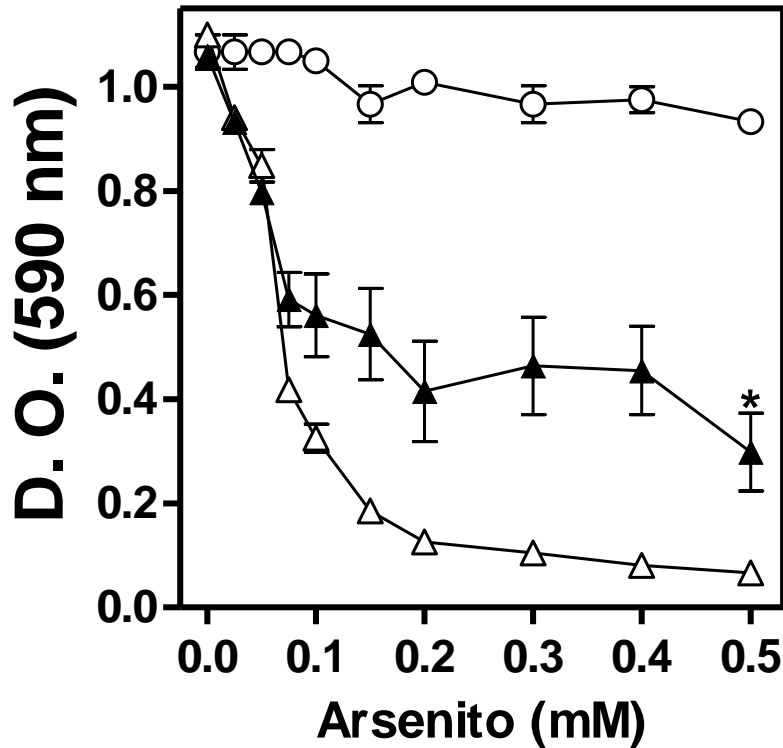


Figura 36. Susceptibilidad a As(III) de *E. coli* AW3110 (pUC_arsB). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó As(III) a las concentraciones indicadas. Donde W3110 (pUCP20) (O), AW3110 (Δ) y AW3110 (pUC_arsB) (▲). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a AW3110 ($p < 0.05$), $n = 3$.

- *E. coli* JW3469-1 (pUC_arsB)

En el caso de JW3469-1 (pUC_arsB), presentó un crecimiento ligeramente mayor comparado a la mutante AW3110; sin embargo, al compararse con el control resistente BW2513, presenta un fenotipo de sensibilidad a As(III) (**Figura 37**). El gen también fue transferido a PAO1; sin embargo, no se obtuvo un resultado positivo, manteniendo a la cepa transformada sensible a As(III) (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos permiten concluir que el gen *arsB* de LB400 es funcional bajo las condiciones ensayadas, siendo más eficiente en AW3110 (pUC_arsB).

2.3 Participación del gen *arsC₁* en la resistencia a As de LB400

Los plásmidos recombinantes pJET_arsC₁ (**Figura 38A**) y pUC_arsC₁ (**Figura 39A**), presentaron los fragmentos esperados de aproximadamente 0.26, 0.90 y 2.73 kb, y 0.90 y 3.86 kb, respectivamente (**Figura 38C y 39B**).

2.3.1 Susceptibilidad a As de las transformantes con el gen *arsC₁*

Los ensayos se realizaron en medio con As(V), utilizando las cepas AW3110 (pUC_arsC₁), JW3470-1 (pUC_arsC₁) y PAO1 (pUC_arsC₁), obteniendo los siguientes resultados:

- *E. coli* AW3110 (pUC_arsC₁)

La cepa AW3110 (pUC_arsC₁) presentó un crecimiento estadísticamente mayor que la mutante AW3110, aunque solamente en algunas concentraciones; sin embargo, presentó un fenotipo de sensibilidad a As(V) (**Figura 40**). Debido a esto se transfirió el gen a la mutante individual JW3470-1, mutada en *arsC*, en espera de esclarecer la participación de *ArsC₁* en la resistencia a As(V).

- *E. coli* JW3470-1 (pUC_arsC₁)

JW3470-1 (pUC_arsC₁) presentó un crecimiento similar a la cepa mutante JW3470-1, concluyendo con un fenotipo de sensibilidad al agente tóxico (**Figura 41A**). Debido a esto se transfirió a *arsC₁* a PAO1, herramienta que anteriormente fue útil para esclarecer la participación del gen *arsC₂* en la resistencia a As(V) (**Figura 33B**).

- *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_arsC₁)

En este caso se observó un comportamiento similar a lo ocurrido con las mutantes AW3110 y JW3470-1; PAO1 (pUC_arsC₁) presentó un crecimiento casi idéntico al control sensible (**Figura 41B**).

Los resultados anteriores permiten concluir que el producto del gen *arsC₁* no es funcional bajo las condiciones ensayadas, al no conferir resistencia a As(V).

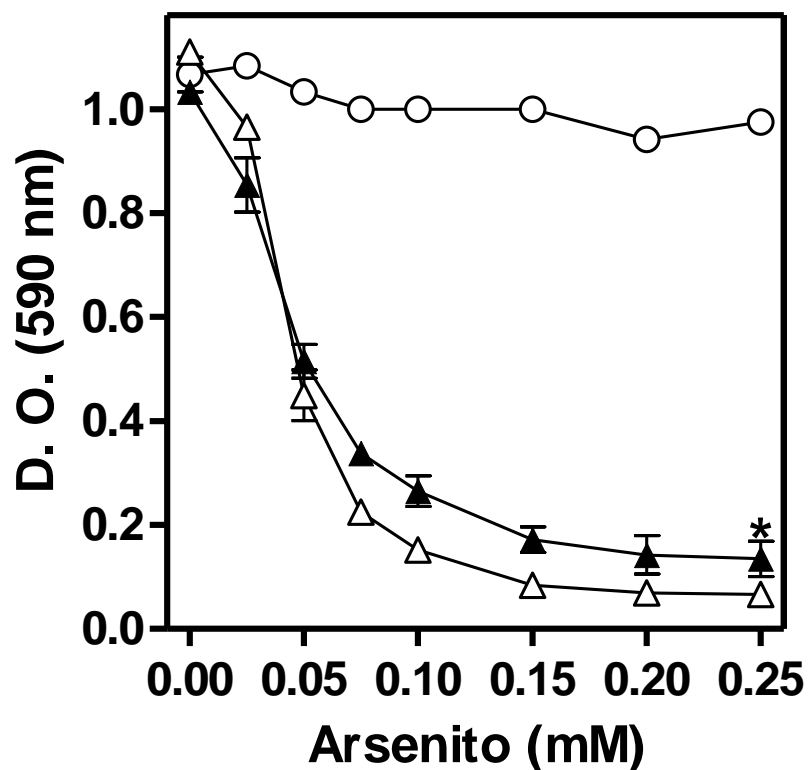


Figura 37. Susceptibilidad a As(III) de *E. coli* JW3469-1 (pUC_arsB). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó As(III) a las concentraciones indicadas. Donde BW25113 (pUCP20) (O), JW3469-1 (Δ) y JW3469-1 (pUC_arsB) (▲). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a JW3469-1 ($p < 0.05$), $n = 3$.

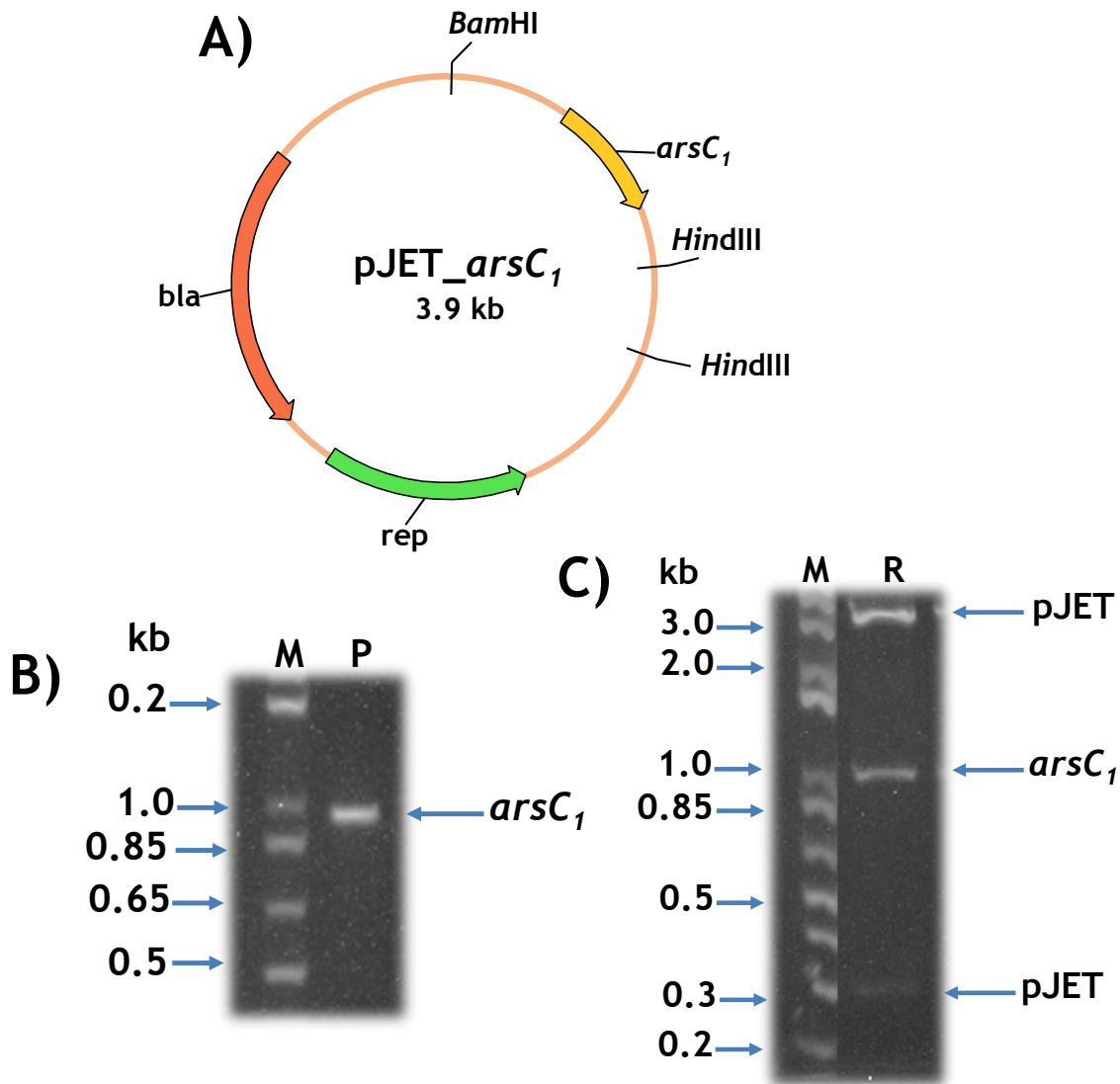


Figura 38. Clonación de *arsC₁* en el vector pJET 1.2/Blunt. A. Mapa genético del plásmido pJET_arsC₁. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción BamHI y HindIII. B. Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR de *arsC₁*. C. Digestión enzimática del plásmido pJET_arsC₁. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; P, producto de PCR de *arsC₁* (0.90 kb); R, producto de digestión con las enzimas BamHI/HindIII; en el lado derecho se señalan las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 0.26 (pJET), 0.90 (*arsC₁*) y 2.73 kb (pJET).

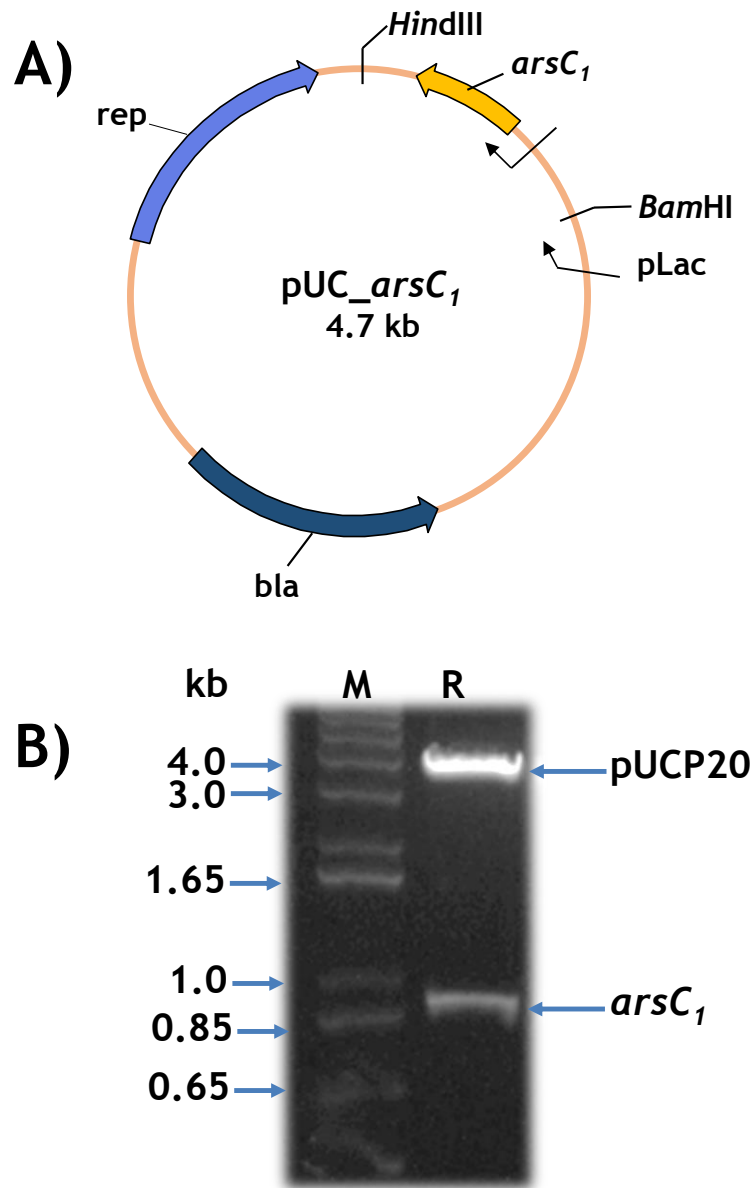


Figura 39. Subclonación de *arsC₁* en el vector pUCP20. A. Mapa genético del plásmido pUC_arsC₁. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. **B.** Gel de agarosa donde se muestra el producto de la restricción enzimática. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; R, producto de restricción con las enzimas *Bam*HI/*Hind*III; en el lado derecho se señalan las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 0.90 (*arsC₁*) y 3.86 kb (pUCP20).

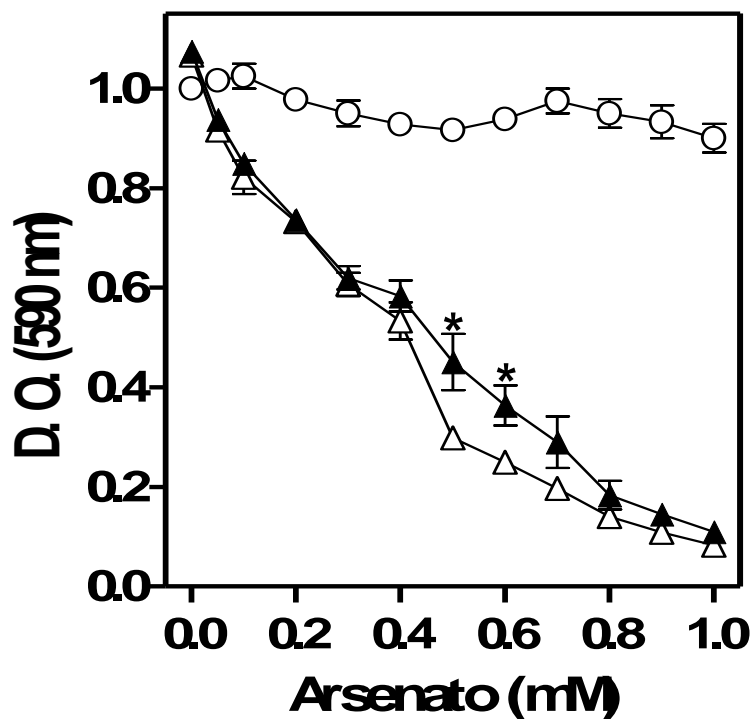


Figura 40. Susceptibilidad a As(V) de *E. coli* AW3110 (pUC_arsC1). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó As(V) a las concentraciones indicadas. Donde W3110 (pUCP20) (O), AW3110 (Δ) y AW3110 (pUC_arsC1) (▲). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a AW3110 ($p < 0.05$), $n = 3$.

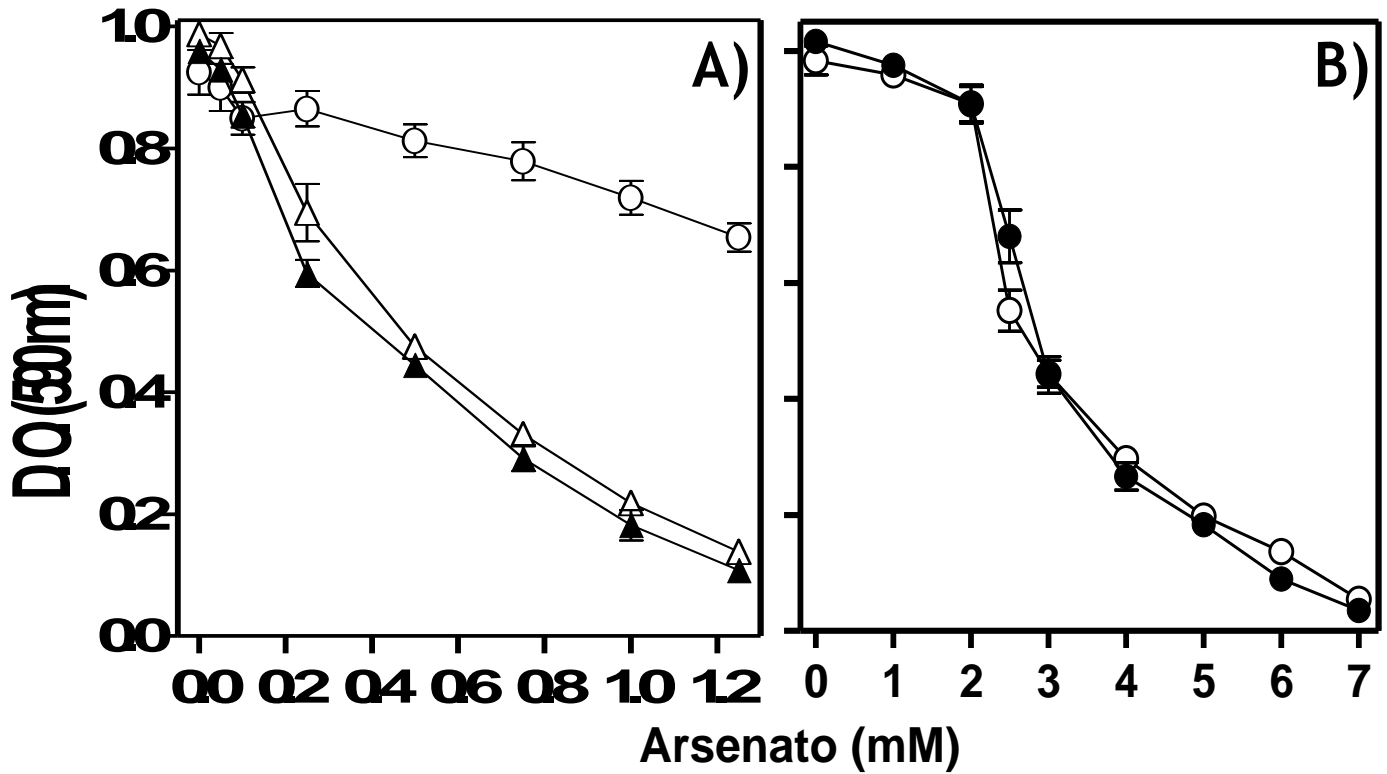


Figura 41. Susceptibilidad a As(V) de *E. coli* JW3470-1 (pUC_arsC₁) y *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_arsC₁). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó As(V) a las concentraciones indicadas. Donde **A.** BW25113 (pUCP20) (O), JW3470-1 (Δ) y JW3470-1 (pUC_arsC₁) (▲) y **B.** *P. aeruginosa* PAO1 (pUCP20) (O) y PAO1 (pUC_arsC₁) (●). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student (p<0.05), n=3.

2.4 Participación del gen *arsC*₃ en la resistencia a As de LB400

Los plásmidos recombinantes pJET_*arsC*₃ y pUC_*arsC*₃ al ser digeridos con las enzimas de restricción (**Figuras 42A y 43A**) presentaron los fragmentos esperados de aproximadamente 0.97 y 2.97 kb, y 0.97 y 3.89 kb, respectivamente (**Figura 42C y 43B**).

2.4.1 Susceptibilidad a As de las transformantes con el gen *arsC*₃

Las transformantes con las arsenato reductasas evaluadas anteriormente (ArsC1 y ArsC2), presentaron un fenotipo diferencial dependiendo de la cepa donde se evaluaron; debido a esto se transfirió el gen *arsC*₃ tanto a las mutantes de *E. coli* AW3110 y JW3470-1, como a *P. aeruginosa* PAO1 para realizar los ensayos de susceptibilidad, obteniendo los siguientes resultados:

- *E. coli* AW3110 (pUC_*arsC*₃)

La cepa AW3110 (pUC_*arsC*₃) presentó un crecimiento muy similar a la mutante AW3110, teniendo un fenotipo de sensibilidad a As(V) (**Figura 44**). Debido a que no se observó la participación de ArsC3 en la resistencia al oxianión se transfirió a la mutante JW3270-1.

- *E. coli* JW3470-1 (pUC_*arsC*₃)

En el caso de la cepa JW3470-1 (pUC_*arsC*₃) se observó un crecimiento idéntico a la mutante JW3470-1, presentando un fenotipo de sensibilidad a As(V) (**Figura 45A**), similar a lo ocurrido con AW3110. Debido a esto se transfirió a PAO1.

- *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_*arsC*₃)

P. aeruginosa PAO1 (pUC_*arsC*₃) presentó un crecimiento similar al control sensible PAO1 (pUCP20), resultando sensible a As(V) (**Figura 45B**).

Por lo tanto se concluye que ArsC3 no es funcional bajo las condiciones ensayadas.

2.5 Participación del gen *arsC*₄ en la resistencia a As de LB400

Los plásmidos recombinantes pJET_*arsC*₄ (**Figura 46A**) y pUC_*arsC*₄ (**Figura 47A**), presentaron los fragmentos esperados de aproximadamente 0.24, 0.60 y 2.73 kb, y 0.60 y 3.87 kb, respectivamente (**Figura 46C y 47B**).

2.5.1 Susceptibilidad a As de las transformantes con el gen *arsC*₄

Al igual que con las arsenato reductasas anteriores, *arsC*₄ fue evaluada en las mutantes de *E. coli* AW3110 y JW3470-1, y *P. aeruginosa* PAO1, obteniendo los siguientes resultados:

- *E. coli* AW3110 (pUC_*arsC*₄)

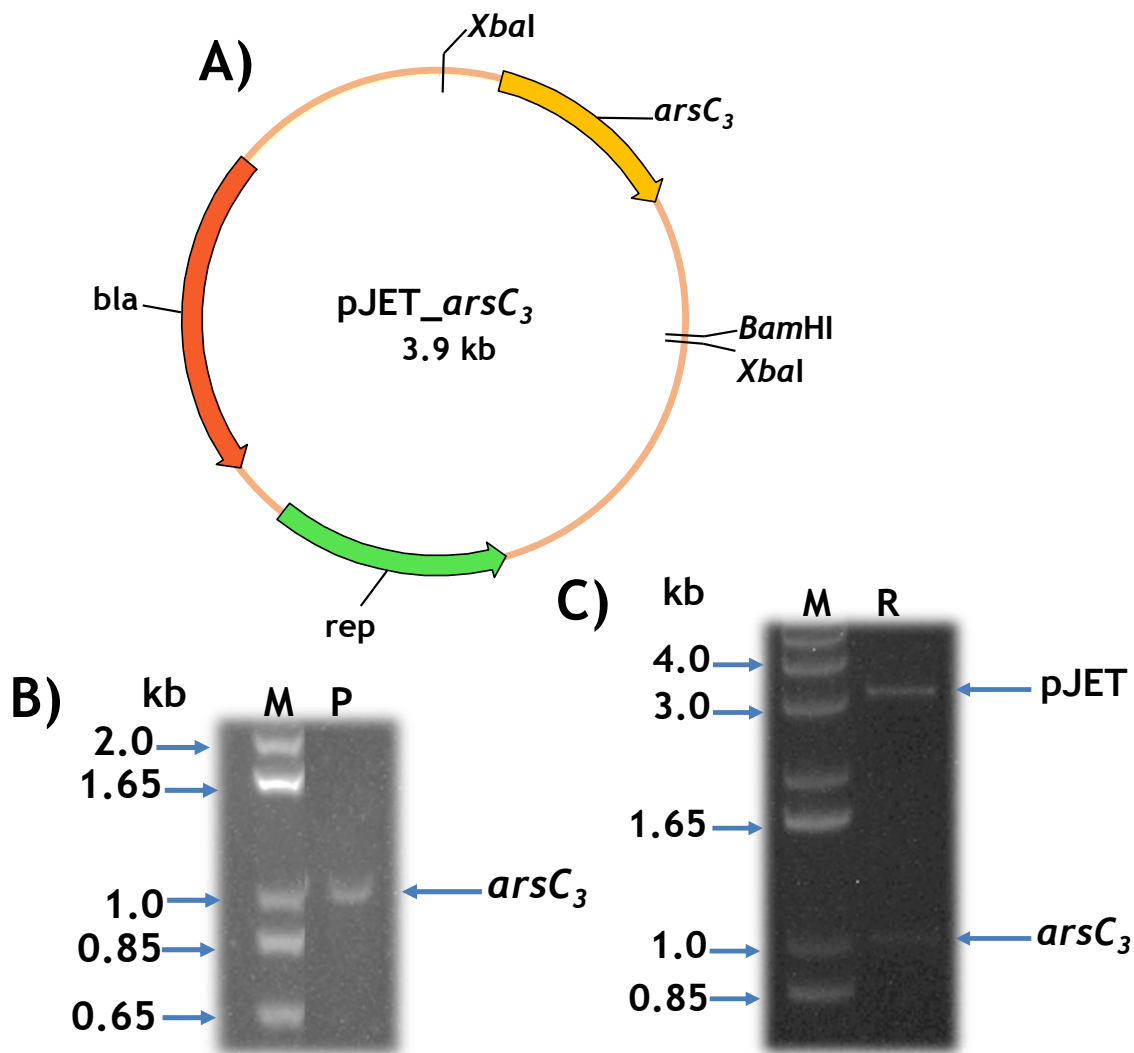


Figura 42. Clonación de *arsC₃* en el vector pJET 1.2/Blunt. A. Mapa genético del plásmido pJET_arsC₃. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción BamHI y XbaI. B. Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR de *arsC₃*. C. Digestión enzimática del plásmido pJET_arsC₃. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; P, producto de PCR de *arsC₃* (0.97 kb); R, producto de digestión con las enzimas BamHI/XbaI; en el lado derecho se señalan las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 0.99 (*arsC₃*) y 2.97 kb (pJET).

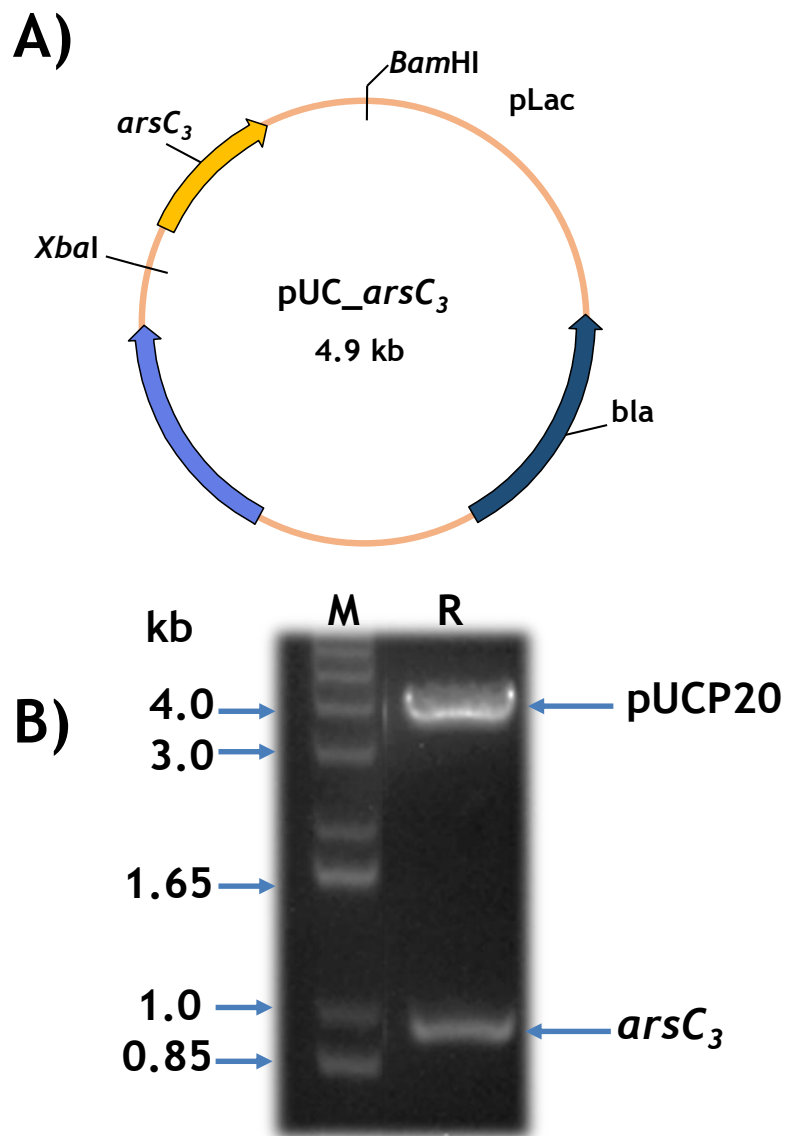


Figura 43. Subclonación de *arsC₃* en el vector pUCP20. A. Mapa genético del plásmido pUC_arsC₃. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xba*I. **B.** Gel de agarosa donde se muestra el producto de la restricción enzimática. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; R, producto de restricción con las enzimas *Bam*HI/*Xba*I; en el lado derecho se señalan las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 0.99 (*arsC₃*) y 3.8 kb (pUCP20).

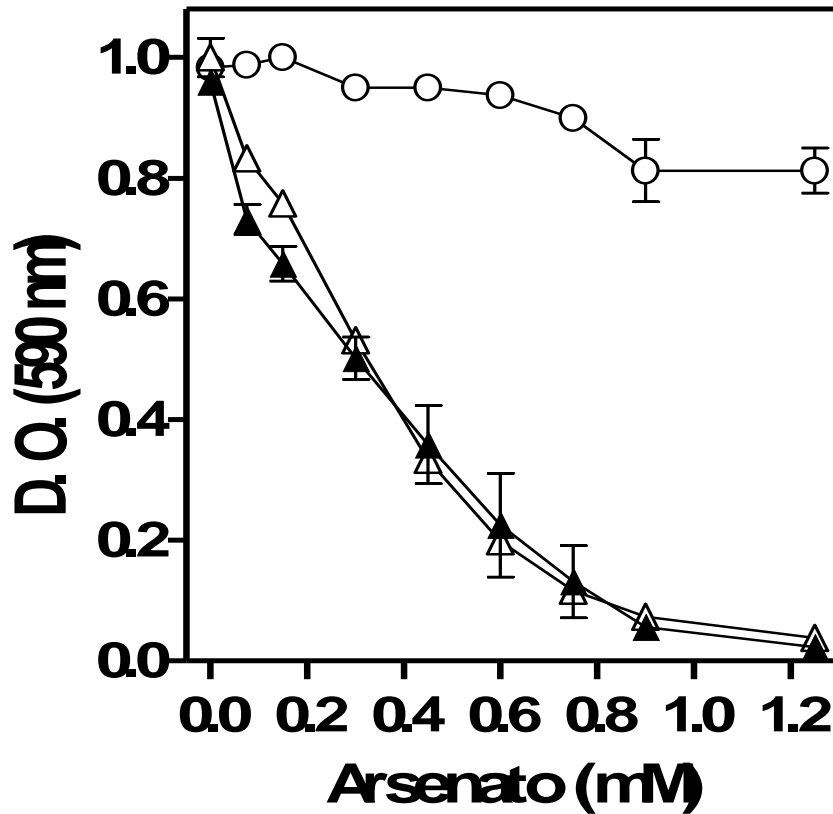


Figura 44. Susceptibilidad a As(V) de *E. coli* AW3110 (pUC_arsC₃). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó As(V) a las concentraciones indicadas. Donde W3110 (pUCP20) (O), AW3110 (Δ) y AW3110 (pUC_arsC₃) (▲). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student ($p < 0.05$), $n = 3$.

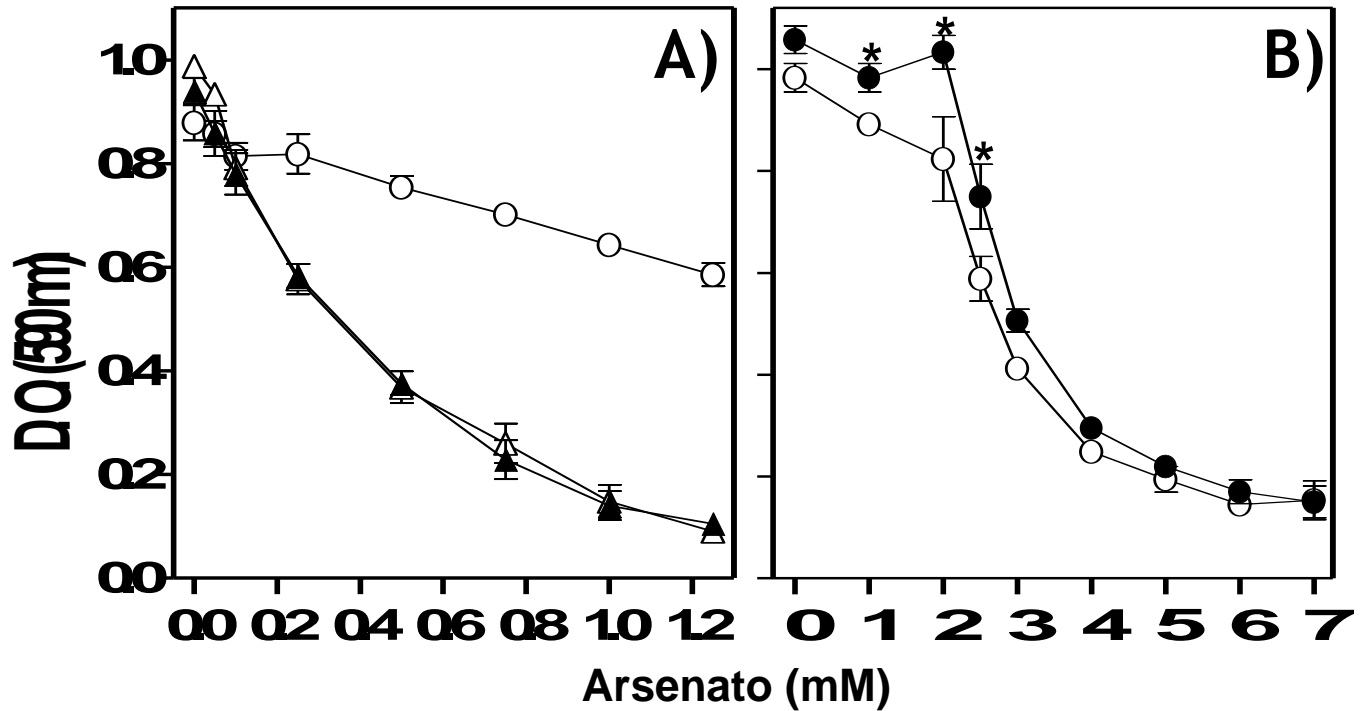


Figura 45. Susceptibilidad a As(V) de *E. coli* JW3470-1 (pUC_arsC₃) y *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_arsC₃). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó As(V) a las concentraciones indicadas. Donde **A.** BW25113 (pUCP20) (O), JW3470-1 (Δ) y JW3470-1 (pUC_arsC₃) (▲) y **B.** *P. aeruginosa* PAO1 (pUCP20) (O) y PAO1 (pUC_arsC₃) (●). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a PAO1(pUCP20) (p<0.05), n=3.

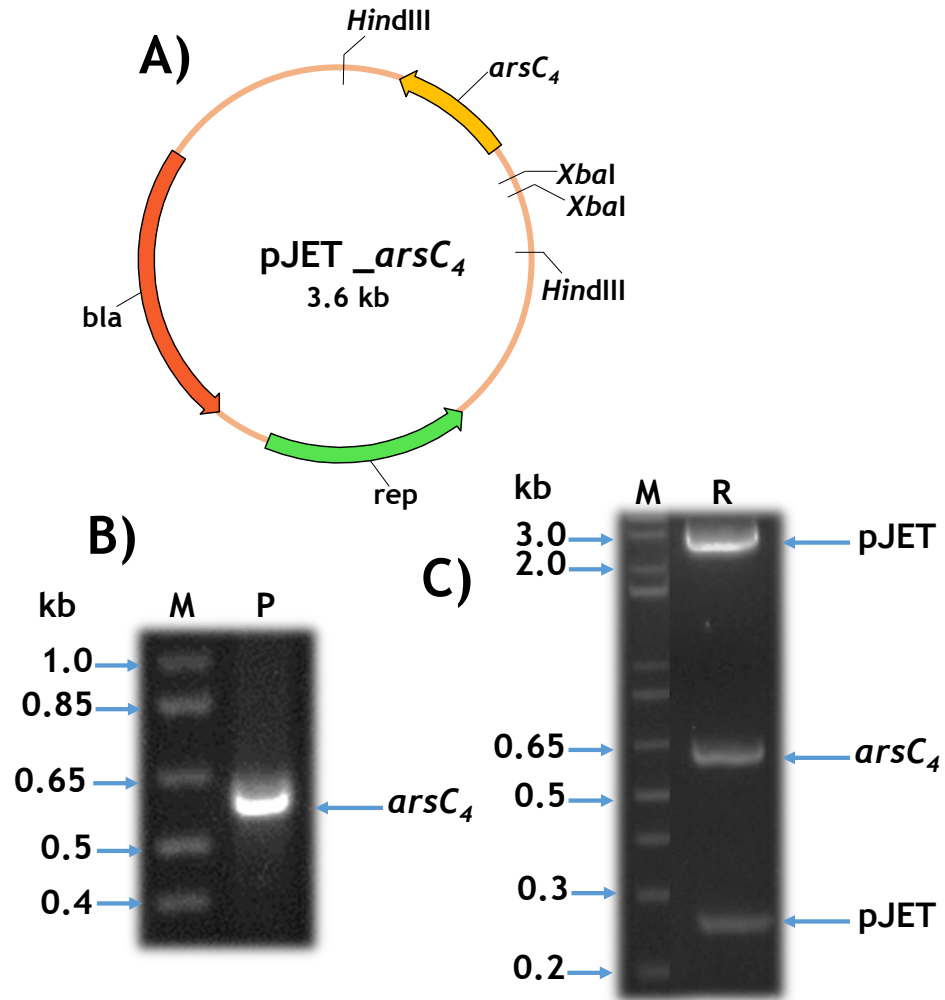


Figura 46. Clonación de *arsC₄* en el vector pJET 1.2/Blunt. A. Mapa genético del plásmido pJET_arsC₄. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción HindIII y XbaI. B. Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR de *arsC₄*. C. Digestión enzimática del plásmido pJET_arsC₄. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; P, producto de PCR de *arsC₄* (0.60 kb); R, producto de digestión con las enzimas HindIII/XbaI; en el lado derecho se señalan las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 0.24 (pJET), 0.60 (*arsC₄*) y 2.73 kb (pJET).

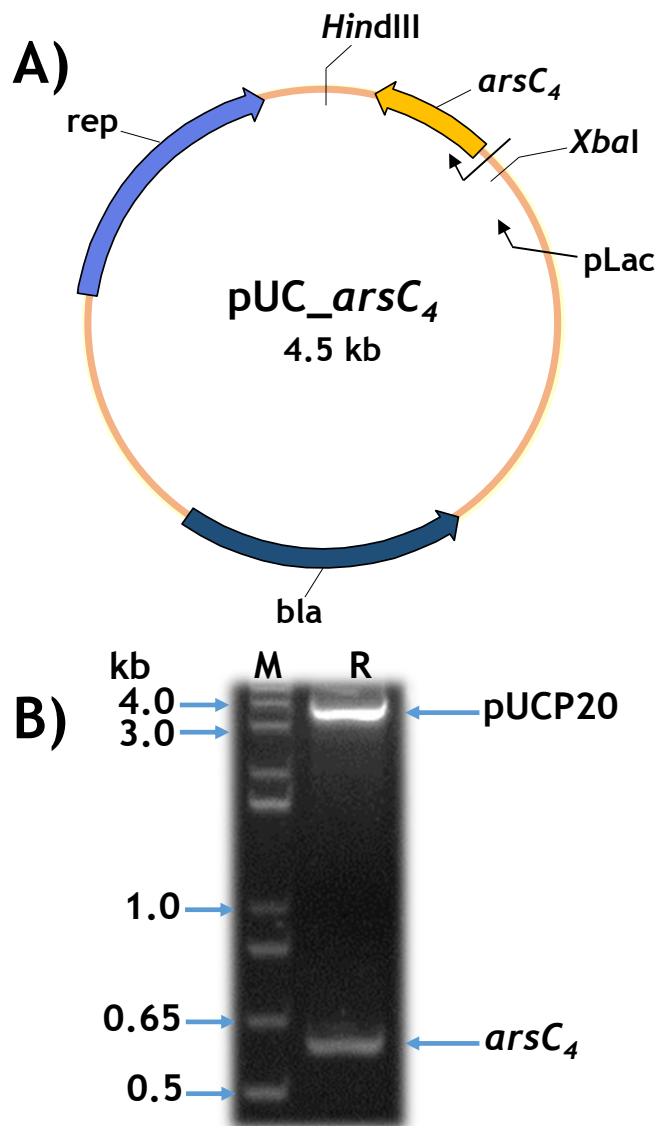


Figura 47. Subclonación de *arsC₄* en el vector pUCP20. A. Mapa genético del plásmido pUC_arsC₄. Se muestran los sitios de corte de las enzimas de restricción *Hind*III y *Xba*I. **B.** Gel de agarosa donde se muestra el producto de la restricción enzimática. M, marcador de tamaño molecular de 1kb; R, producto de restricción con las enzimas *Hind*III/*Xba*I; en el lado derecho se señalan las bandas del tamaño esperado, de aproximadamente 0.60 (*arsC₄*) y 3.87 kb (pUCP20).

La cepa transformante AW3110 (pUC_arsC₄) presentó un crecimiento similar a la mutante AW3110, con un fenotipo de sensibilidad a As(V) (**Figura 48**).

- *E. coli* JW3470-1 (pUC_arsC₄)

JW3470-1 (pUC_arsC₄) presentó un crecimiento ligeramente mayor, en las concentraciones más elevadas de As(V), comparado al control sensible, aunque menor comparado con el control resistente (**Figura 49A**).

- *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_arsC₄)

En un medio con As(V), *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_arsC₄) presentó un crecimiento similar al control sensible (**Figura 49B**).

Por lo tanto se concluyó que el producto del gen *arsC₄* es funcional confiriendo resistencia a As(V) bajo las condiciones en las que se ha evaluado.

3. Evaluar la expresión de los genes *arsB* y *arsC* de LB400 en ausencia y presencia de arsenito

3.1 Búsqueda de regiones promotoras del extremo 5' de los genes *ars* de LB400

Previo a los ensayos de expresión mediante RT-PCR, se realizó un análisis *in silico* para identificar regiones conservadas de elementos genéticos de regulación de los genes *ars* de LB400. Se analizaron las regiones río arriba del extremo 5' del operón *arsRacrCH* y de los genes *arsB*, *arsC₁*, *arsC₃* y *arsC₄* y se compararon con las secuencias promotoras σ^{28} , σ^{32} , σ^{54} y σ^{70} de *E. coli*. Obteniendo los siguientes resultados:

- **Operón *arsRacrCH***

Se identificaron elementos genéticos en la región consenso -35 y -10 correspondientes a un probable promotor relacionado con el factor σ^{70} (**Figura 50**).

- **Genes *arsB*, *arsC₁*, *arsC₃* y *arsC₄***

En los cuatro genes *ars* individuales se identificó un probable promotor del mismo tipo relacionado con el factor σ^{32} (**Figuras 51, 52, 53 y 54**).

Debido a los distintos probables promotores identificados se sugiere que el grupo de genes en análisis presenta una expresión diferencial: el operón probablemente se expresa en condiciones normales de crecimiento, mientras que los genes individuales probablemente se expresan bajo alguna condición de estrés.

3.2 Análisis *in silico* del probable regulador ArsR

Al hablar de un operón *ars*, un elemento importante es la proteína reguladora ArsR, la cual

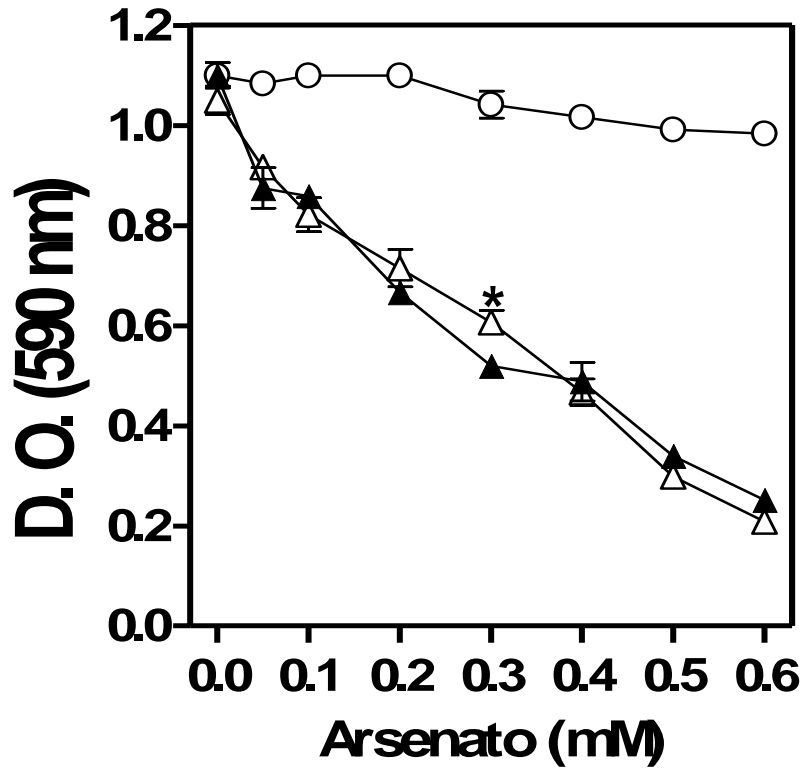


Figura 48. Susceptibilidad a As(V) de *E. coli* AW3110 (pUC_arsC4). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó As(V) a las concentraciones indicadas. Donde W3110 (pUCP20) (O), AW3110 (Δ) y AW3110 (pUC_arsC4) (▲). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a AW3110 ($p < 0.05$), $n = 3$.

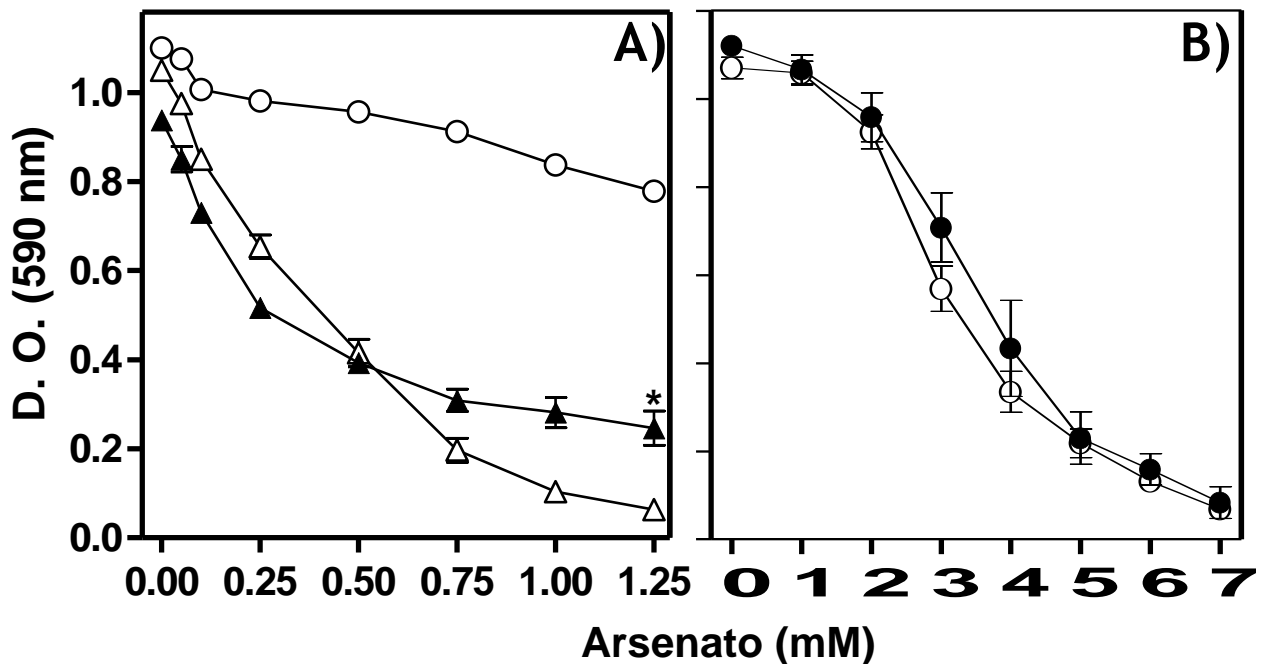


Figura 49. Susceptibilidad a As(V) de *E. coli* JW3470-1 (pUC_arsC₄) y *P. aeruginosa* PAO1 (pUC_arsC₄). Los cultivos se crecieron en CN por 24 h a 37°C con agitación constante y se les adicionó As(V) a las concentraciones indicadas. Donde **A.** BW25113 (pUCP20) (O), JW3470-1 (Δ) y JW3470-1 (pUC_arsC₄) (▲) y **B.** *P. aeruginosa* PAO1 (pUCP20) (O) y PAO1 (pUC_arsC₄) (●). La susceptibilidad se determinó en función de la absorbencia a 590 nm. Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto a JW3470-1 (p<0.05), n=3.

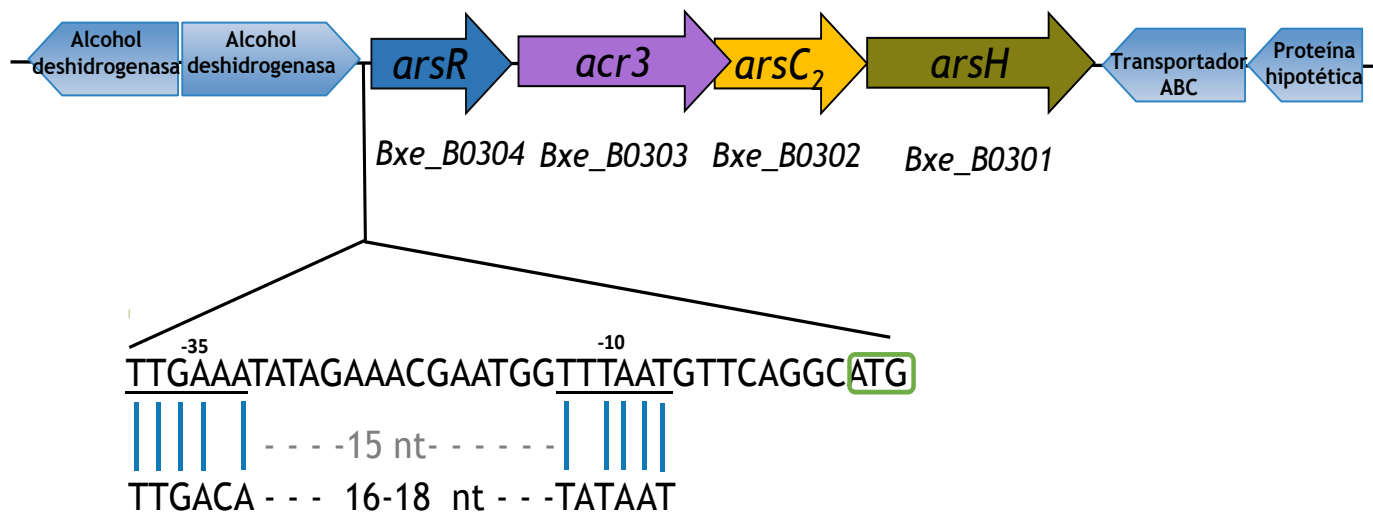


Figura 50. Probable región promotora del operón *arsRacrCH* de *B. xenovorans* LB400. Se muestran los genes que conforman al operón *arsRacrCH* (flechas), el código de acceso en la base de datos del genoma de *B. xenovorans* LB400 de cada uno de los genes (Bxe) y el contexto genómico. En la parte inferior se muestra la secuencia río arriba del gen *arsR* donde se localizó la probable región promotora. Se señalan las cajas -35 y -10 identificadas; en la parte inferior se muestra la secuencia consenso reconocida por el factor σ^{70} de *E. coli* donde se indican en líneas verticales los nucleótidos que coinciden en ambas secuencias y se resalta en verde el codón de inicio de la traducción.

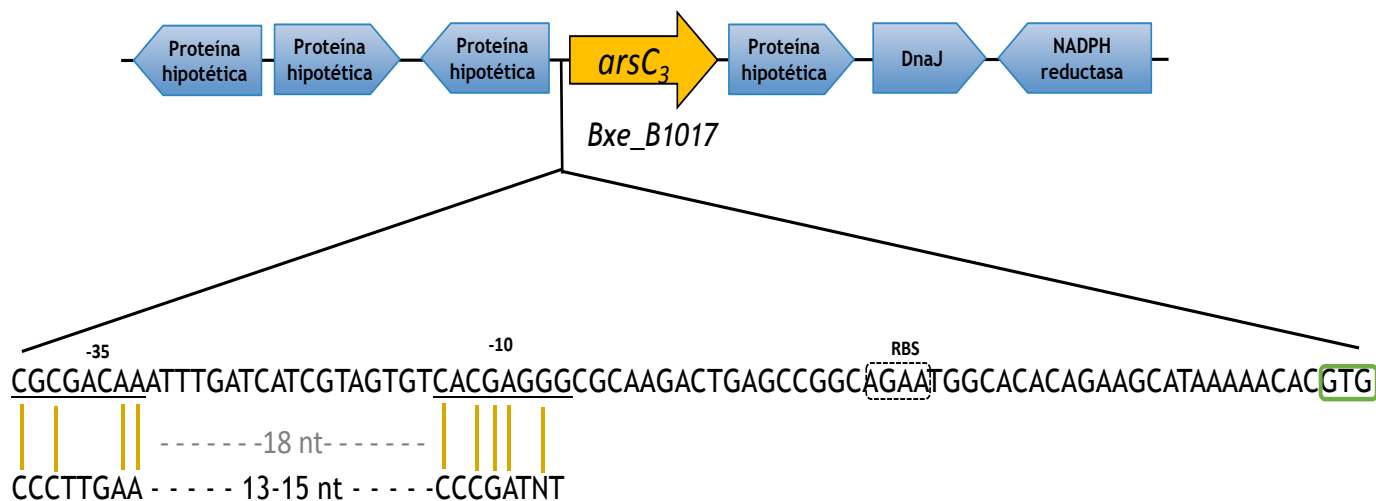


Figura 53. Probable región promotora del gen *arsC₃* de *B. xenovorans* LB400. Se muestra al gen *arsC₃* (flecha rosa), su código de acceso en la base de datos del genoma de *B. xenovorans* LB400 (*Bxe_B1017*) y el contexto genómico. En la parte inferior se muestra la secuencia río arriba donde se localizó la probable región promotora. Se señalan las cajas -35 y -10 identificadas, el sitio de unión al ribosoma (RBS); en la parte inferior se muestra la secuencia consenso reconocida por el factor σ^{32} de *E. coli* donde se indican en líneas verticales los nucleótidos que coinciden en ambas secuencias y se resalta en verde el codón de inicio de la traducción.

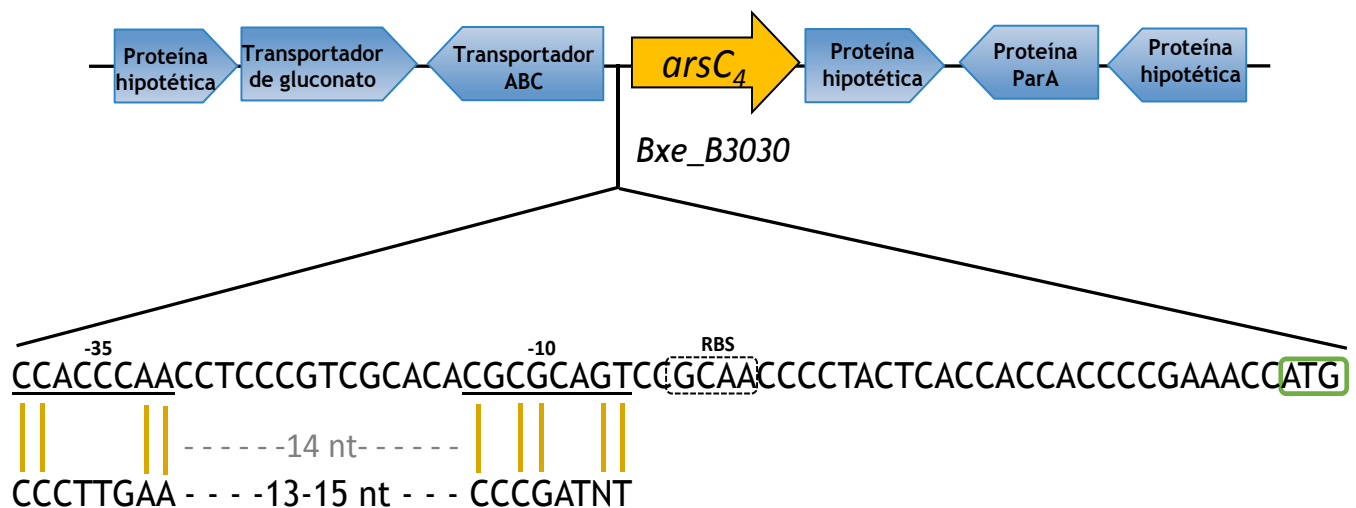


Figura 54. Probable región promotora del gen *arsC₄* de *B. xenovorans* LB400. Se muestra al gen *arsC₄* (flecha rosa), su código de acceso en la base de datos del genoma de *B. xenovorans* LB400 (Bxe_B3030) y el contexto genómico. En la parte inferior se muestra la secuencia río arriba donde se localizó la probable región promotora. Se señalan las cajas -35 y -10 identificadas, el sitio de unión al ribosoma (RBS); en la parte inferior se muestra la secuencia consenso reconocida por el factor σ^{32} de *E. coli* donde se indican en líneas verticales los nucleótidos que coinciden en ambas secuencias y se resalta en verde el codón de inicio de la traducción.

es codificada por el gen *arsR*, y es la encargada de regular la expresión de los genes que conforman dicho operón. Debido a esto se decidió analizar a detalle la proteína reguladora ArsR3 codificada por el gen *arsR* del probable operón *ars* de LB400.

Se realizó un alineamiento múltiple de ArsR con proteínas ArsR caracterizadas en otros organismos (*Burkholderia sp.*, *Burkholderia aspalathi*, *Caballeronia choica* y *Agrobacterium tumefaciens*), con la finalidad de determinar si ArsR presentaba los elementos conservados en la familia de metarreguladores SmtB/ArsR. En el alineamiento realizado, ArsR presentó el dominio de unión a DNA o dominio HTH (Gajiwala y Burley, 2000) requerido para su interacción con la región reguladora del operón *ars*. Además se identificaron las Cys conservadas correspondientes al sitio catalítico, región donde el As(III) interacciona con la proteína (Kang y col., 2016). También se identificó una Cys adicional conservada en ArsR y en las ArsR de cepas pertenecientes a la orden *Burkholderiales* (**Figura 55**). Los resultados obtenidos sugieren que *arsR* codifica un probable regulador, ArsR, el cual actúa controlando la expresión de los genes *ars* adyacentes.

3.3 Inducción de la resistencia a As de LB400

Para determinar si la resistencia a As de LB400 es inducible, se realizaron ensayos de inducción con As(V) y con As(III); previamente, en cinéticas de crecimiento, se establecieron las concentraciones tóxicas de As(V) (**Figura 56A**) y As(III) (**Figuras 56B**) a utilizar, considerando 15.0 y 0.5 mM, respectivamente, como las concentraciones a usar. Para la concentración inductora se utilizó de manera arbitraria la décima parte de la concentración establecida como tóxica de cada compuesto. Además, se realizaron cinéticas de crecimiento para establecer el tiempo adecuado para adicionar la concentración tóxica de As(V) o As(III), concluyendo que 4 h era el tiempo en que el cultivo presentaba un crecimiento adecuado para observar la probable inducción (datos no mostrados). En cada caso se evaluó la inducción de la resistencia a As(V) y As(III) utilizando como inductor a ambos compuestos.

En los ensayos de inducción se obtuvieron los siguientes resultados:

- **Inducción con As(V)**

El As(V) como inductor generó una disminución del crecimiento tanto de los cultivos inducidos como de los no inducidos. En el caso del medio donde el As(V) actuó además como agente tóxico, el oxianión causó menos daño ya que los cultivos no presentaron un efecto notorio en el crecimiento tras la adición de la concentración tóxica (**Figura 57A**), mientras que en el medio con As(III) después de la adición del oxianión se presentó una clara disminución del crecimiento (**Figura 57B**), lo cual va en relación a que la especie trivalente es más tóxica que la pentavalente; sin embargo, en ambos casos los cultivos continuaron creciendo siendo los cultivos inducidos los que claramente presentaron un mayor crecimiento comparado con los no inducidos (**Figura 57**).

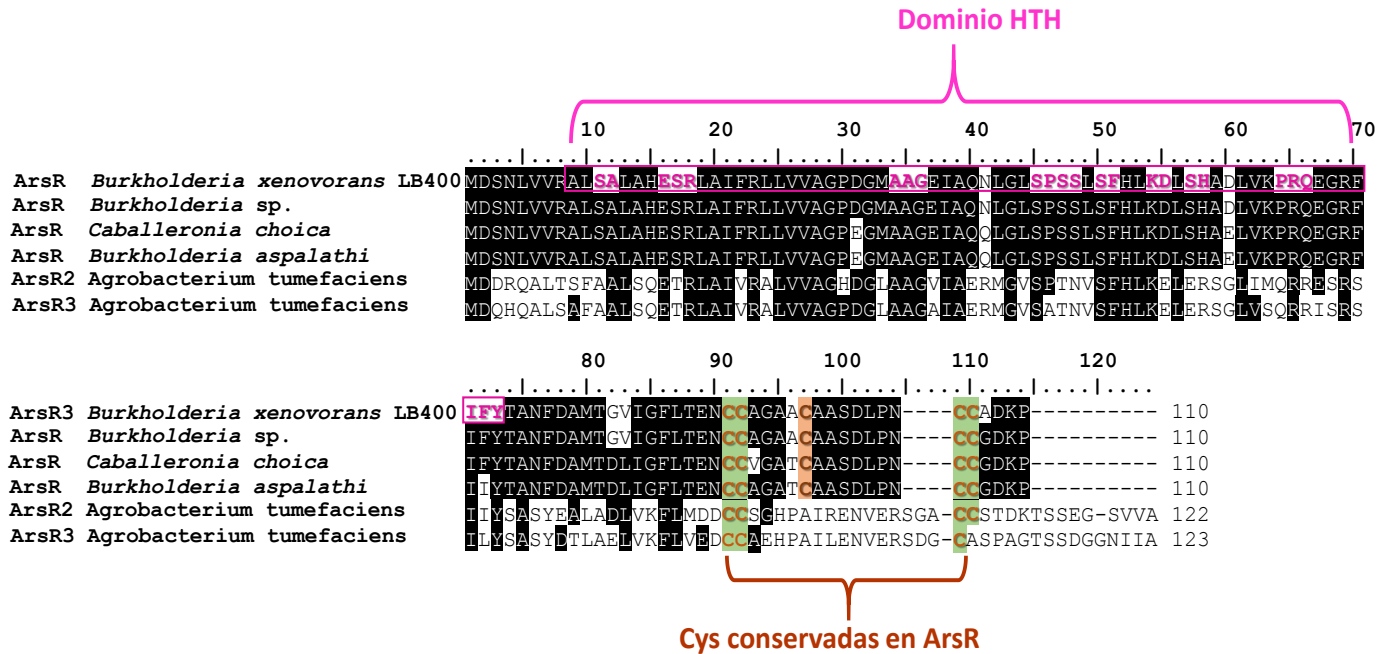


Figura 55. Alineamiento de la proteína ArsR del operón de *B. xenovorans* LB400. Se muestra el alineamiento múltiple de ArsR de *B. xenovorans* LB400 con proteínas ArsR caracterizadas en otras especies. Se indican en recuadros negros los aminoácidos idénticos; en rosa los aminoácidos que forman parte del dominio HTH y en verde las Cys conservadas que representan el sitio catalítico de la proteína. Además, se identificó una Cys adicional conservada en ArsR y las ArsR de cepas pertenecientes a la orden *Burkholderiales*, señalada en recuadros naranjas.

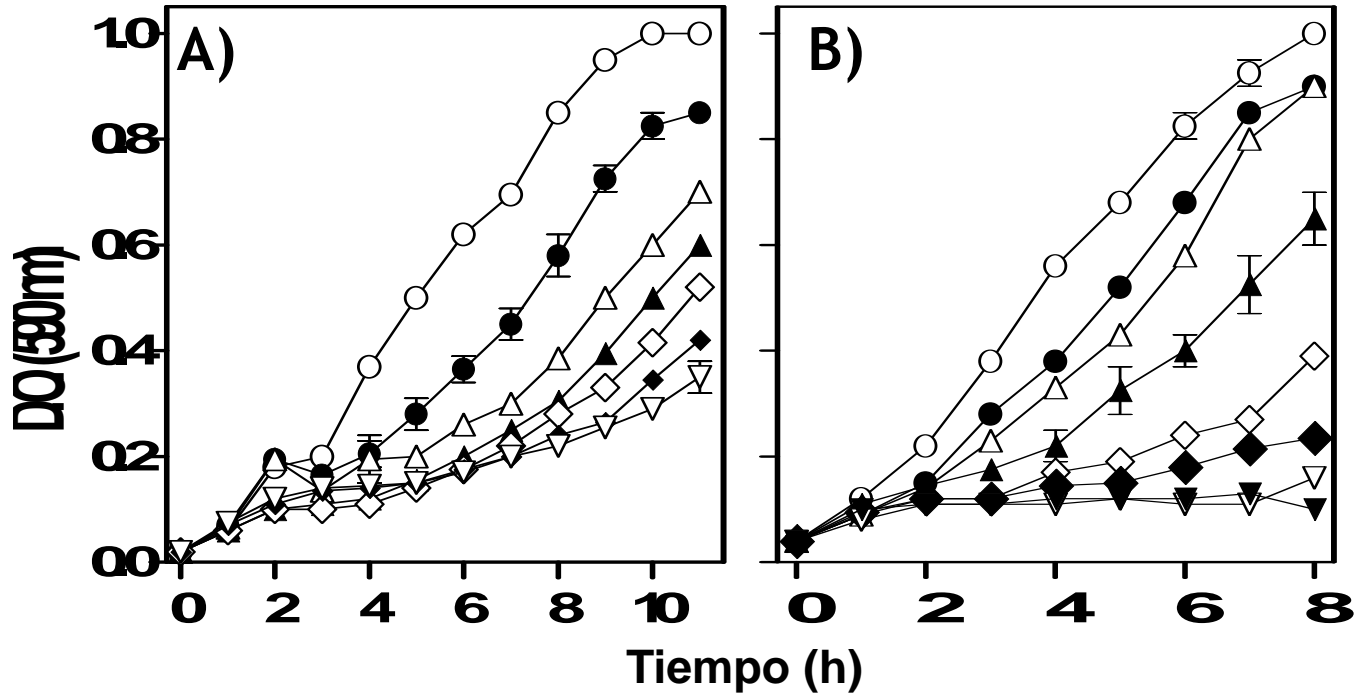


Figura 56. Determinación de la concentración tóxica de As(V) y As(III) de *B. xenovorans* LB400. Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación constante y a tiempo cero se añadió el agente tóxico. **A.** As(V), donde 0 mM (O), 3 mM (●), 9 mM (Δ), 15 mM (▲), 18 mM (◇), 24 mM (□) y 27 mM (▽). **B.** As(III), donde 0 mM (O), 0.15 mM (●), 0.25 mM (Δ), 0.5 mM (▲), 0.75 mM (◇), 1.0 mM (□), 1.25 mM (▽) y 1.5 mM (▼). Se midió el crecimiento del cultivo a intervalos en función de la absorbencia a 590 nm. n=2.

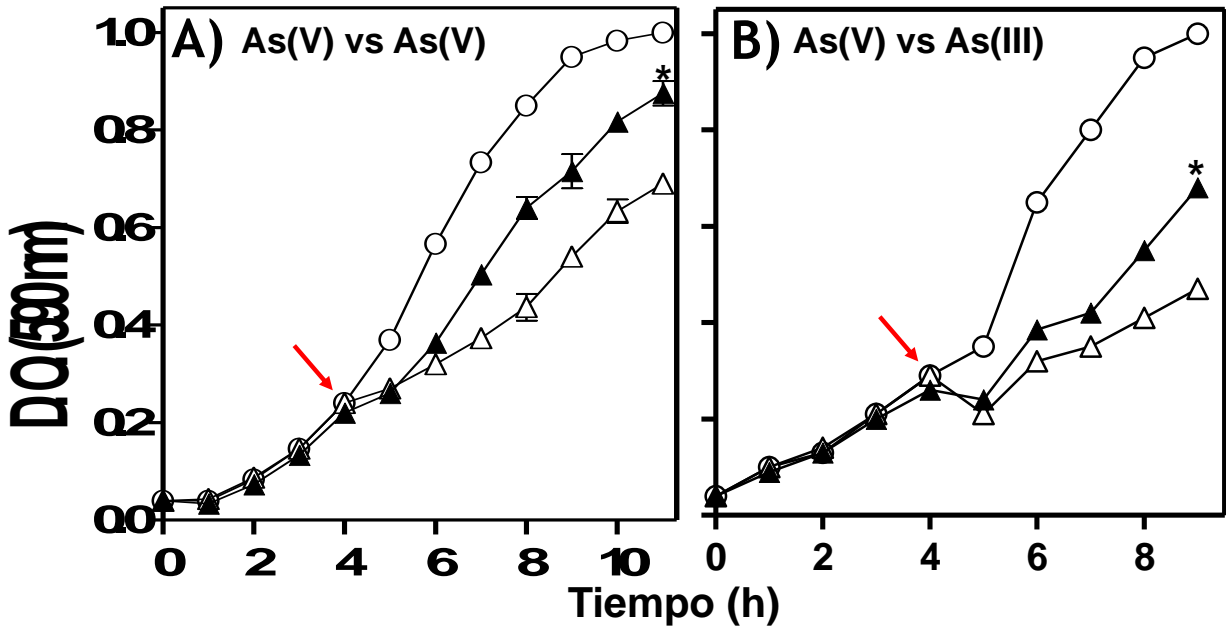


Figura 57. Inducción de la resistencia a As de *B. xenovorans* LB400 con As(V). Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación constante y a tiempo cero se añadió el agente inductor, 1.5 mM de As(V). A las 4 h se les adicionó a cada cultivo la concentración tóxica (flecha): **A.** 15 mM de As(V) y **B.** 0.5 mM de As(III), y se midió el crecimiento del cultivo a intervalos en función de la absorbencia a 590 nm. Para ambos casos, cultivo control (O), cultivo no inducido (Δ) y cultivo inducido (▲). Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto al cultivo no inducido ($p < 0.05$), $n=2$.

- **Inducción con As(III)**

En el caso de los ensayos utilizando como inductor al As(III), se observó que la adición del oxianión, como se esperaba, generó una disminución del crecimiento de los cultivos; similar a lo ocurrido en los ensayos de inducción con As(V) descritos anteriormente. La adición de la concentración tóxica de As(III) provocó un daño mayor comparado con el As(V), el cultivo requirió de una hora tras la adición del As(III) (**Figuras 58A**) para continuar creciendo, mientras que en el medio con As(V) los cultivos no detuvieron el crecimiento (**Figuras 58B**). En ambos casos, el cultivo inducido presentó un crecimiento mayor comparado al cultivo no inducido (**Figuras 58**) y conforme transcurrió el tiempo la diferencia entre ambos cultivos fue significativa. Por lo tanto se concluye que *B. xenovorans* LB400 presenta genes de resistencia a As cuya expresión se induce por la previa exposición a concentraciones subinhibitorias de As(III) y As(V).

3.4 Expresión de los genes *ars* de LB400

Los ensayos de expresión se realizaron mediante RT-PCR, utilizando dos muestras de RNA pertenecientes a LB400; una aislada de un cultivo en fase exponencial sin inducir y la otra de un cultivo similar pero inducido con 0.15 mM de As(III), concentración elegida en ensayos preliminares, que fue añadida a tiempo cero. Para cada análisis se incluyeron como control negativo una reacción en la que se sustituyó el RNA por agua y como control positivo el ensayo de PCR correspondiente. Cabe señalar que esta técnica permite detectar DNA amplificado a partir del DNA complementario (DNAc) generado de una muestra de RNA por acción de la enzima Retrotranscriptasa, lo cual significa que evalúa la transcripción de los genes de forma indirecta.

- **Operón *arsRacrCH***

El grupo de genes *arsRacrCH* se ha considerado como un probable operón; sin embargo, hasta este punto no se ha demostrado tal hecho. Por tal motivo fue necesario evaluar la co-expresión del grupo de genes que conforman el probable operón; para ello se diseñaron oligonucleótidos que permitían la amplificación de las regiones intergénicas, teniendo un total de 3 fragmentos: *arsR-acr3*, *acr3-arsC₂* y *arsC₂-arsH* (**Tabla 5**).

Previamente se determinó que el gen *arsR* codifica un probable regulador ArsR (**Figura 55**). La expresión de los genes *arsR* de operones *ars* caracterizados (*arsR* de R773 y pI258) se induce en presencia de As(III), debido a esto antes de evaluar la co-expresión de las regiones intergénicas del grupo de genes *arsRacr3C₂H* se decidió determinar si la expresión de *arsR* era inducida por As(III). Para esto se diseñaron oligonucleótidos que amplificaran una región interna del gen (**Tabla 5**). Como resultado se obtuvo la banda correspondiente al amplificado del gen *arsR* (181 pb) sólo en el ensayo realizado con el RNA extraído del cultivo inducido con As(III) (**Figura 59**), lo cual permite concluir que la expresión de *arsR* es inducida por As(III). Este resultado arrojó la posibilidad de que el grupo de genes *arsRacrCH* corresponda

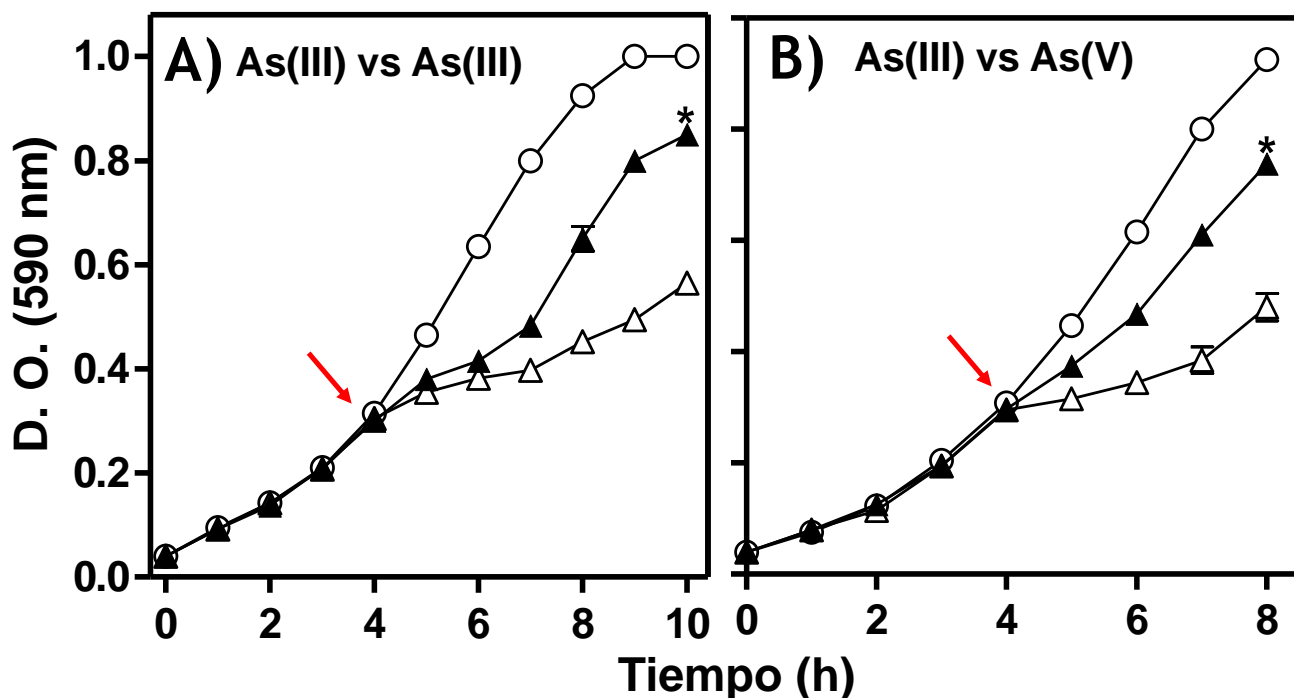


Figura 58. Inducción de la resistencia a As de *B. xenovorans* LB400 con As(III). Los cultivos se crecieron en CN a 37°C con agitación constante y a tiempo cero se añadió el agente inductor, 0.05 mM de As(III). A las 4 h se les adicionó a cada cultivo la concentración tóxica (flecha): **A.** 0.5 mM de As(III) y **B.** 15 mM de As(V), y se midió el crecimiento del cultivo a intervalos en función de la absorbencia a 590 nm. Para ambos casos, cultivo control (O), cultivo no inducido (Δ) y cultivo inducido (\blacktriangle). Se muestran las barras de error estándar de la media; t-Student, * cambios significativos respecto al cultivo no inducido ($p < 0.05$), $n=2$.

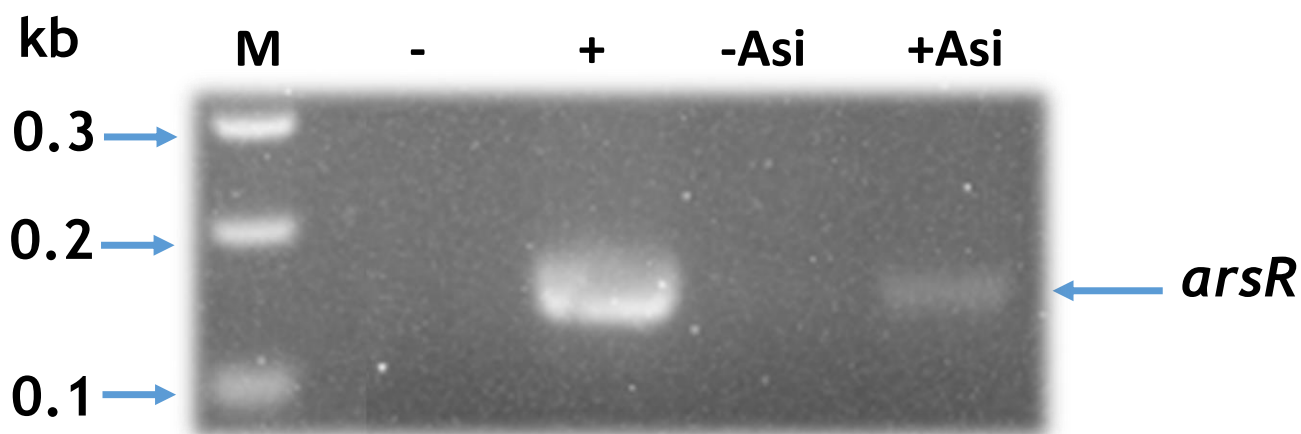


Figura 59. Ensayo de expresión del gen *arsR* de *B. xenovorans* LB400. Gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los resultados del RT-PCR. Se señala la banda correspondiente al amplificado del gen *arsR* (181 pb). M, marcador de tamaño molecular de 1kb; -, reacción con agua (Control negativo); +, reacción con DNA (Control positivo de amplificación); -Asi, reacción con RNA extraído de un medio sin As(III) y +Asi, reacción con RNA extraído de un medio con 0.15mM de As(III).

a un operón inducible con As(III).

Posteriormente para determinar que el grupo de genes *arsRacrCH* corresponde a un operón *ars* y que por lo tanto se transcriben como un único RNA mensajero (RNAm), se evaluó la co-transcripción de las regiones intergénicas *arsR-acr3*, *acr3-arsC₂* y *arsC₂-arsH* en espera de obtener los fragmentos amplificados de 440, 383 y 435 pb, respectivamente; esto en presencia de As(III) teniendo en cuenta los resultados anteriores con el gen *arsR*. Sin embargo, en los ensayos de RT-PCR realizados no se lograron identificar las bandas correspondientes en ninguna de las muestras de RNA. Por lo tanto, hasta este punto no es posible confirmar que el grupo de genes correspondan a un operón *ars* inducible por As(III).

En el caso de los genes *ars* individuales, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar regiones internas de los mismos (**Tabla 5**). A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los genes:

- **Gen *arsB***

En el ensayo de RT-PCR donde se evaluó la expresión del gen *arsB* se esperaba una banda de 611 pb correspondiente a la amplificación de la región interna del gen; sin embargo, el fragmento de DNA no se observó a partir de ninguna de las muestras de RNA utilizadas. Por lo tanto, la expresión del gen *arsB* no se logró detectar bajo las condiciones utilizadas.

- **Gen *arsC₁***

El fragmento interno de DNA correspondiente al gen *arsC₁* (535 pb) se detectó en los ensayos de RT-PCR realizados con el RNA extraído de un medio con As(III) (**Figura 60**), y aunque la banda obtenida fue muy tenue, se concluye que la expresión del gen *arsC₁* se induce en presencia de As(III).

- **Gen *arsC₃***

En el ensayo de RT-PCR del gen *arsC₃* se esperaba un amplificado de DNA de 296 pb, correspondiente a la región interna del gen. En éste caso, se obtuvieron bandas del tamaño señalado en las reacciones con RNA extraído en ausencia y presencia de As(III); para ambos casos las bandas fueron tenues, manteniendo la misma intensidad entre ellas (**Figura 61**). Por lo tanto, se concluyó que la expresión de *arsC₃* no es inducida por As(III).

- **Gen *arsC₄***

Para el gen *arsC₄*, el fragmento interno de DNA esperado era de 215 pb. La banda del tamaño señalado fue obtenida en los ensayos de RT-PCR realizados con el RNA extraído tanto en ausencia como en presencia de As(III); sin embargo, la cantidad de amplificado de DNA obtenido a partir del RNA inducido con As(III) presentó mayor intensidad (**Figura 62**).

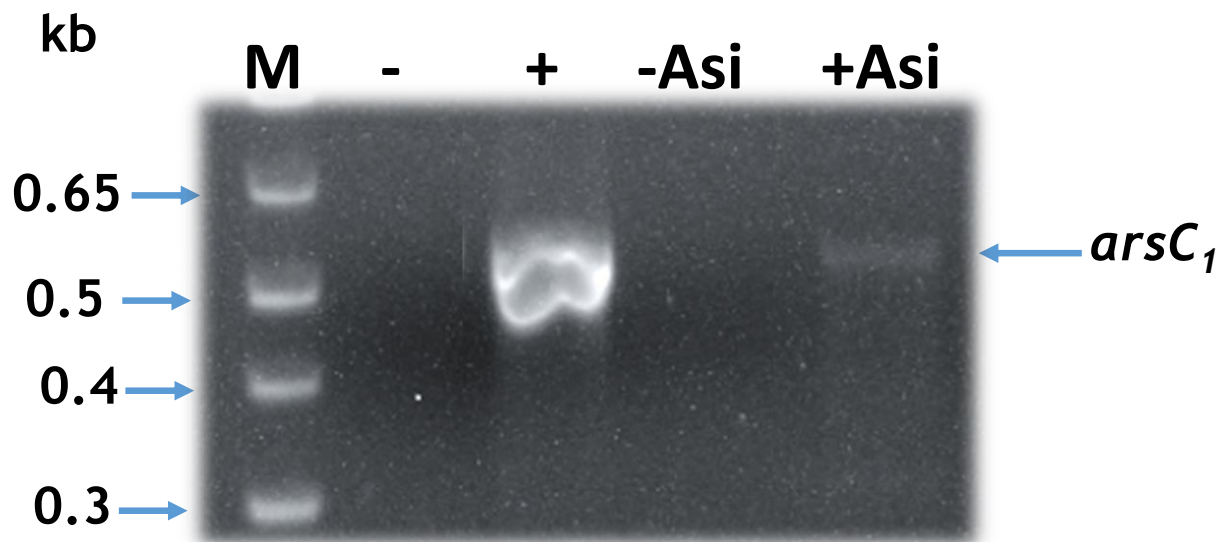


Figura 60. Ensayo de expresión del gen *arsC₁* de *B. xenovorans* LB400. Se muestra el gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los resultados del RT-PCR. Se señala la banda correspondiente al amplificado del gen *arsC₁* (535 pb). M, marcador de tamaño molecular de 1kb; -, reacción con agua (Control negativo); +, reacción con DNA (Control positivo de amplificación); -Asi, reacción con RNA extraído de un medio sin As(III) y +Asi, reacción con RNA extraído de un medio con 0.15mM de As(III).

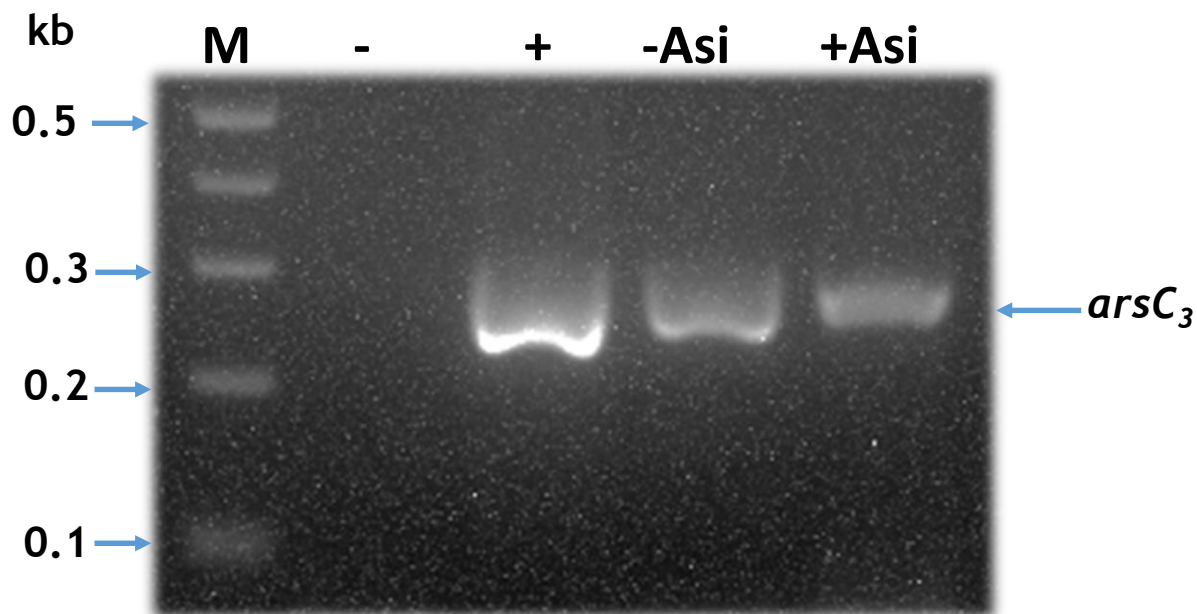


Figura 61. Ensayo de expresión del gen *arsC₃* de *B. xenovorans* LB400. Se muestra el gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los resultados del RT-PCR. Se señala la banda correspondiente al amplificado del gen *arsC₃* (296 pb). M, marcador de tamaño molecular de 1kb; -, reacción con agua (Control negativo); +, reacción con DNA (Control positivo de amplificación); -Asi, reacción con RNA extraído de un medio sin As(III) y +Asi, reacción con RNA extraído de un medio con 0.15mM de As(III).

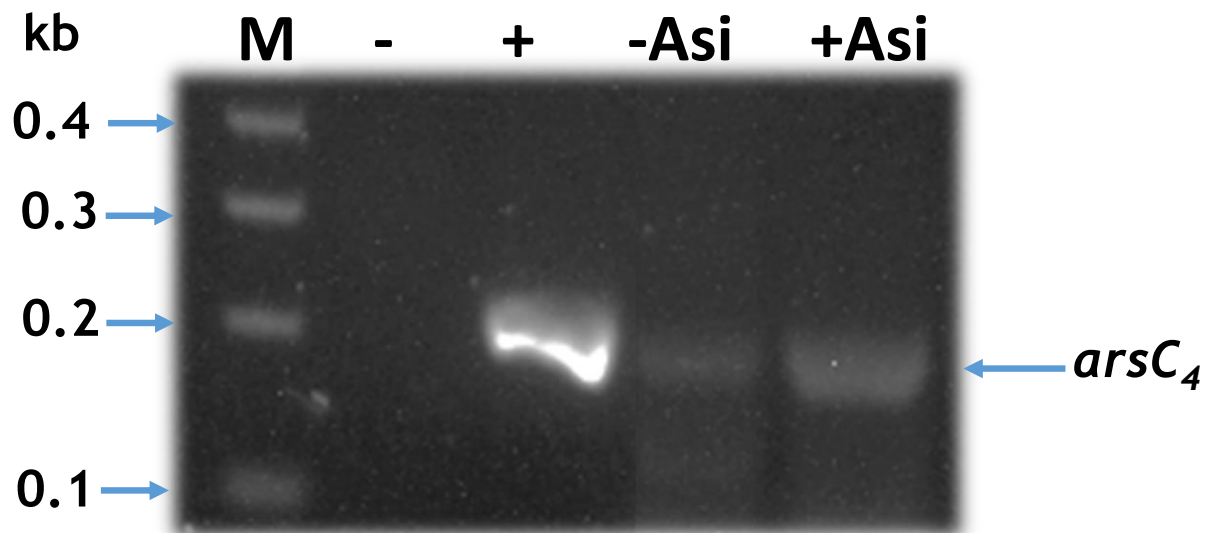


Figura 62. Ensayo de expresión del gen *arsC₄* de *B. xenovorans* LB400. Se muestra el gel de agarosa al 1.5% donde se muestran los resultados del RT-PCR. Se señala la banda correspondiente al amplificado del gen *arsC₄* (215 pb). M, marcador de tamaño molecular de 1kb; -, reacción con agua (Control negativo); +, reacción con DNA (Control positivo de amplificación); -Asi, reacción con RNA extraído de un medio sin As(III) y +Asi, reacción con RNA extraído de un medio con 0.15mM de As(III).

Por lo tanto, se concluye que la expresión del gen *arsC₄* se induce en presencia de As As(III).

X. RESUMEN DE RESULTADOS

1. El genoma de *B. xenovorans* LB400 codifica dos transportadores de As(III): Acr3 y ArsB, y cuatro Arsenato reductasas: ArsC1, ArsC2, ArsC3 y ArsC4; de los cuales Acr3 y ArsC2 son codificados por el operón *arsRacrCH*.
2. El operón *arsRacrCH* es funcional confiriendo resistencia a As.
3. El gen *arsR* codifica un regulador ArsR cuya expresión es inducida por As(III).
4. El gen *arsB* es funcional confiriendo resistencia a As(III), sin embargo, no se detectó su expresión en las condiciones utilizadas.
5. El gen *arsC1* no confiere resistencia a As(V) en las cepas evaluadas, sin embargo su expresión es inducida por As(III).
6. El gen *arsC3* se expresa constitutivamente sin embargo, no confiere resistencia a As(V).
7. El gen *arsC4* participa moderadamente en la resistencia a As(V); además, su expresión es inducida en cultivos con As(III).

XI. DISCUSIÓN

El Arsénico se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre (Cervantes y col., 1994) y ha sido señalado como el carcinógeno ambiental número 1 (Yang y Rosen, 2016) debido a la toxicidad de sus diferentes formas químicas, en específico de las especies inorgánicas pentavalentes y trivalentes, representadas por los oxianiones de As(V) y As(III) (Oremland y col., 2009).

Se considera que el As ha estado presente desde el origen de la tierra, interaccionando constantemente con los organismos vivos, principalmente con los microorganismos (Li y col., 2014). La relación contaminante-microorganismo probablemente condujo a la aparición de los sistemas de resistencia a As (González y col., 2013). De hecho, se ha propuesto que sin los sistemas de resistencia al metaloide la vida sobre la tierra no hubiese sido posible (Yang y Rosen, 2016).

Los sistemas de resistencia a As se han descrito en cromosomas y plásmidos procarióticos, principalmente los codificados por los genes *ars* (Yang y Rosen, 2016). El sistema más común de resistencia al metaloide radica en la reducción del As(V) a As(III) por acción de una arsenato reductasa y la posterior expulsión del As(III) a través de bombas (Li y col., 2014). Hoy en día se han caracterizado diversas variantes del sistema general, conduciendo a sistemas de resistencia más complejos (**Tabla 1**), indicando la constante necesidad de los organismos vivos de defenderse ante los efectos tóxicos del metaloide.

Anteriormente, en análisis filogenéticos se reportó la presencia de genes *ars* en cepas del género *Burkholderia*, pero éstos no se han analizado a nivel molecular (Li y col., 2014). Sin embargo, en la cepa en estudio en este trabajo, *Burkholderia xenovorans* LB400, no se ha reportado la presencia de genes de resistencia a As, lo cual llamó la atención al tratarse de una cepa que presenta una versatilidad fenotípica y metabólica. Por ejemplo, LB400 fue aislada de un ambiente contaminado con bifenilos policlorados, presenta un genoma relativamente grande (9.73 Mpb) comparado a otras bacterias, tiene una elevada redundancia génica (17.6%) en comparación con bacterias de vida libre (Chain y col., 2006) y en nuestro grupo de trabajo ha sido ampliamente estudiada por sus múltiples genes de resistencia a cromato (Acosta-Navarrete y col., 2014; Reyes-Gallegos y col., 2016).

Considerando que LB400 proviene de un ambiente contaminado (Chain y col., 2006) y dado que cuenta con un sistema caracterizado de resistencia a cromato (Acosta-Navarrete y col., 2014; Reyes-Gallegos y col., 2016), fue razonable considerar que esta cepa probablemente contara con sistemas de resistencia a As. Debido a esto, en 2016 Reyes-Gallegos realizó una búsqueda de probables genes *ars* en el genoma de LB400. Se identificaron 8 genes *arsR*, 3 genes *arsB*, 2 genes *arsC* y 1 gen *arsH*, los cuales probablemente estaban relacionados con la resistencia al metaloide. Esto condujo a que en 2017, Salgado-Lora realizara ensayos de

susceptibilidad al metaloide, concluyendo que *B. xenovorans* LB400 es resistente a As en comparación con una cepa estándar de *E. coli* (**Figura 12**).

El presente proyecto abordó el análisis de los genes que codifican un fenotipo de resistencia a las especies inorgánicas de As, As(V) y As(III), siendo dirigido a los genes *arsB*, que codifican una probable bomba de expulsión de As(III) y *arsC*, que codifican una probable arsenato reductasa.

Primeramente se realizó un análisis filogenético de los genes señalados como *arsB* y *arsC* en LB400, con la finalidad de verificar que pertenezcan a familias caracterizadas, identificar probables transportadores de As(III) o arsenato reductasas adicionales y determinar el grupo filogenético al que pertenecen las proteínas codificadas por dichos genes.

El análisis filogenético realizado por Li y col. en 2014 señaló que el género *Burkholderia* presenta únicamente transportadores de As(III) de la familia Acr3; sin embargo, el genoma de LB400 indicaba la presencia de genes para tres proteínas ArsB (**Tabla 8**). Debido a esto, el análisis se inició con la familia de transportadores de As(III) ArsB. Las proteínas molde para realizar el análisis fueron ArsB codificadas en los plásmidos R773 de *E. coli* (Chen y col., 1986) y pI258 de *S. aureus* (Ji y Silver, 1992), primeras proteínas caracterizadas de ambas familias de transportadores. La base de datos generada de las probables ArsB de LB400 presentó 38 proteínas, incluyendo a ArsB1 y ArsB3 (**Figuras 15 y 16**). El alineamiento múltiple de las 38 probables ArsB generó un árbol donde la mayoría de las proteínas, incluyendo a ArsB1, se localizaron distantes a las ArsB caracterizadas y además presentaron valores de identidad de su secuencia de aminoácidos menores al 14% (**Figura 15**); estos valores sugieren que las proteínas en análisis no se encuentran filogenéticamente relacionadas. ArsB1 en específico presentó valores de identidad de 9.4 y 9.9% con ArsB R773 y ArsB pI258 (**Figura 15**), respectivamente, datos relativamente bajos que establecieron que ArsB1 no corresponde a los transportadores de As(III) de la familia ArsB, por lo que fue descartada del análisis.

Por otro lado, ArsB3, Bxe_B2638 y Bxe_C0981 se localizaron en la misma rama que ArsB de R773 y pI258 (**Figura 16**), además de que presentaron los mayores porcentajes de identidad (17-22%) en relación a los transportadores caracterizados. Los valores de identidad de ArsB3, Bxe_B2638 y Bxe_C0981 son relativamente bajos; sin embargo, se encuentran dentro de los límites que comúnmente son utilizados para considerar la existencia de homología entre las proteínas. Bxe_B2638 y Bxe_C0981 se señalan como probables transportadores de la familia ABC de sulfonato y nitrato/sulfonato/bicarbonato, respectivamente, aunque ninguno se ha caracterizado.

El alineamiento múltiple generado tras la edición de la base de datos señaló a ArsB3, que presentó los mayores valores de identidad con ArsB R773 y pI258 (26.6 y 25%, respectivamente), mientras que Bxe_B2638 y Bxe_C098, presentaron valores menores al

20% (**Figura 17A**). Los porcentajes de identidad claramente se reflejaron en los árboles tanto del alineamiento múltiple (**Figura 17B**) como del análisis filogenético (**Figura 18**), donde es clara e indudable la relación existente entre ArsB3 y los ArsB de R773 y pI258 que se agrupan en la misma rama dejando fuera a Bxe_B2638 y Bxe_C098. Por lo tanto, se estableció que ArsB3 es el único transportador de As(III) perteneciente a la familia ArsB del genoma de LB400.

El análisis de los transportadores de As(III) continuó en el genoma de LB400 con la familia Acr3. La base de datos inicial contaba con 12 proteínas, dentro de las cuales sorpresivamente se encontró a la proteína señalada como ArsB2. Al realizar el alineamiento múltiple se observó que únicamente ArsB2 presentó un porcentaje de identidad relativamente elevado (26.7%) con la proteína Acr3 molde, Tn Acr3, perteneciente a *Bacillus subtilis* (Sato y Kobayashi, 1998); el resto de las secuencias no superó el 10% de identidad (**Figura 19**). Además, la relación se mantuvo en el árbol generado donde ArsB2 y Tn Acr3 se agruparon en la misma rama, distantes del resto de las proteínas (**Figura 20**). La excepción fue Bxe_B1806 que también se localizó en la misma rama; sin embargo, no se consideró relevante ya que presentó un porcentaje de identidad de 9.1%, valor que comúnmente es considerado bajo para establecer relaciones filogenéticas con Tn Acr3. Lo anterior permitió concluir que LB400 cuenta con dos probables transportadores de As(III), ArsB2 y ArsB3 denominados en el resto del trabajo como Acr3 y ArsB, respectivamente. La presencia de un transportador de cada tipo probablemente proporciona al organismo una mayor capacidad ante los efectos tóxicos del As(III) y Antimonito [Sb(III)].

El Sb(III) puede ser expulsado por las bombas de expulsión ArsB (Ji y Silver, 1992), dada su similitud química con el As(III); un ejemplo de este fenómeno es *Ochrobactrum tritici* SCII24 (Branco y col., 2008), bacteria capaz de crecer en un medio con As(III) o Sb(III).

Por parte de las arsenato reductasas, se ha indicado que las *Burkholderias* comúnmente presentan diversas copias de los genes que codifican proteínas ArsC (Li y col., 2014). En el caso de LB400, el análisis de su genoma indicaba dos probables ArsC, sin especificar la familia a la que pertenecían. El análisis inició con la familia ArsC_{Grx/GSH}, utilizando como modelo a la ArsC de R773 (Chen y col., 1986). La base de datos inicial fue de 15 proteínas donde se incluyó a ArsC1 y ArsC2 (**Tabla 8**); en el alineamiento múltiple, ambas proteínas presentaron los mayores porcentajes de identidad con ArsC de R773 Grx/GSH (65.7 y 41.7%), respectivamente, además de tener una identidad relativamente elevada entre ellas (40.9%) (**Figura 21**). El resto de las proteínas en análisis presentaron valores de identidad que no superaron el 18%. En dicho análisis resaltaron Bxe_A1669 y Bxe_B1460 que, a pesar de presentar porcentajes relativamente bajos de identidad con la proteína molde, mostraron una identidad del 23% con ArsC2. En el árbol generado, se obtuvo a ArsC1 y ArsC2 presentes en la misma rama con ArsC de R773 Grx/GSH, siendo ArsC1 la que mostró una relación más estrecha (**Figura 22**); junto a ellas se localizó Bxe_B0451, proteína que no había sido señalada debido a que en el reporte de identidades presentó un valor relativamente bajo

(14.9%) con la proteína molde (**Figura 21**). Por otra parte, Bxe_A1669 y Bxe_B1460, que anteriormente mostraron relación con ArsC2, se localizaron en ramas distantes a ésta (**Figura 22**). Hasta este punto fue posible determinar que ArsC1 y ArsC2 son arsenato reductasas pertenecientes a la familia ArsC_{Grx/GSH}; sin embargo, el surgimiento de otras probables ArsC condujo a la elaboración de un análisis más detallado donde se incluyeron otras ArsC caracterizadas.

En el análisis de las ArsC_{Trx}, utilizando como proteína molde ArsC_{Trx} de pI258 (Ji y Silver, 1992), se obtuvo una base de datos de 20 proteínas de LB400; el alineamiento múltiple de las 20 proteínas resaltó a cinco proteínas que presentaron valores relativamente elevados de identidad (20-24%) con pI258 Trx (Bxe_B0508, Bxe_B1017, Bxe_B1727, Bxe_2556 y Bxe_C1087) (**Figura 23**). En el árbol generado, estas secuencias se agruparon con la proteína molde, siendo Bxe_B1017 la que presentó una relación más cercana (**Figura 24**). Las cinco proteínas indicadas anteriormente se encuentran señaladas en el genoma de LB400 como probables Tirosina fosfatasa, lo cual no rompe la conexión con las ArsC ya que existe evidencia de que las ArsC_{Trx} tienen una relación evolutiva con las enzimas llamadas fosfatasa de bajo peso molecular (PTPasa-LMW) (Bennett y col., 2001). En el alineamiento múltiple, las cinco proteínas presentaron porcentajes similares de identidad con pI258 Trx (22-25%) (**Figura 25A**), además de que en el árbol generado todas surgieron a partir de la misma rama que la proteína molde, a excepción de Bxe_B1017 (**Figura 25B**). Hasta este punto no era posible descartar a ninguna de las probables secuencias candidatas por lo cual se elaboraron árboles filogenéticos para esclarecer la existencia de relaciones evolutivas. Con ambos métodos filogenéticos se obtuvieron árboles con la misma topología, donde Bxe_B1017 es la única proteína que se agrupó en la misma rama con pI258 Trx mientras que el resto se mostró en una rama separada (**Figura 26**); estos resultados difieren de lo obtenido anteriormente por lo que se mantuvo el grupo de las cinco proteínas y se procedió a ampliar el análisis.

El grupo de proteínas que se mantenían sin una relación definida con las ArsC moldes utilizadas se reunieron en un alineamiento múltiple con ArsC de diferentes especies caracterizadas. Los árboles filogenéticos generados indicaron claramente ambas familias de arsenato reductasas; ArsC1 y ArsC2 mantuvieron la relación que se observó anteriormente, localizándose dentro del grupo de ArsC_{Grx/GSH} (**Figura 27**), mientras que el grupo de probables ArsC de LB400 se agruparon entre sí en una rama independiente, a excepción de Bxe_A1669 y Bxe_B1017 que se localizaron en el grupo de ArsC_{Grx/GSH} y ArsC_{Trx}, respectivamente. Bxe_A1669 presentó valores de identidad relativamente elevados con ArsC_{Grx/GSH} de *Salmonella enterica* (Veeraraghavan y col., 2016) y *Neisseria gonorrhoeae* (43.1% y 45.2%, respectivamente), y Bxe_B1017 presentó identidad con la ArsC_{Trx} de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Cai y col., 1998) y *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 (Butcher y Rawlings, 2002) (32.9 y 27.8%, respectivamente) (**Figura 28**).

Lo anterior condujo a concluir que LB400 cuenta con cuatro probables proteínas ArsC: ArsC1 (Bxe_A1669) del cromosoma 1, ArsC2 (Bxe_B0302) y ArsC4 (Bxe_B3030) del cromosoma 2, pertenecientes a la familia ArsC_{Grx/GSH}, y ArsC3 (Bxe_B1017), también del cromosoma 2, perteneciente a la familia ArsC_{Trx}.

La presencia simultánea de secuencias de ambas familias ArsC es común en proteobacterias donde inclusive se han encontrado formando parte de un mismo operón. Por ejemplo, en *Herminiimonas arsenicoxydans* (Muller y col., 2007), *Ochrobactrum tritici* (Branco y col., 2008) y *Sinorhizobium sp.* (Drewniak y col., 2013), organismos que presentan una resistencia relativamente elevada a As(V). Esto lleva a considerar que la presencia de secuencias de ambas familias de arsenato reductasas permite a los microorganismos ampliar las rutas metabólicas contribuyendo con la reducción del As(V), representando un sistema con mayor eficiencia comparado a los organismos que únicamente cuentan con un solo tipo de ArsC (Muller y col., 2007). Anteriormente se observó que LB400 es más tolerante al oxianión As(V), al comparar su crecimiento en As(III) en concentraciones relativamente equivalentes [12.5 mM de As(V) y 1.25 mM de As(III)] (**Figura 12**), teniendo en cuenta que el As(III) es aproximadamente 10 veces más tóxico que el As(V) (Chen y col., 2016); lo anterior indica que el sistema de reducción de As(V) de LB400 es más efectivo que el sistema de expulsión del As(III), lo que probablemente esté relacionado con el número y variedad de arsenato reductasas que presenta, tal es el caso de *Ochrobactrum tritici* SCII24, cepa que presenta dos arsenato reductasas ambas codificadas por un mismo operón y pertenecientes a familias diferentes, las cuales confieren un nivel de resistencia a As(V) (200mM) cuatro veces mayor que a As(III) (50mM) (Branco y col., 2008).

El análisis filogenético de los genes de resistencia a As de LB400 expone que el organismo cuenta con un sistema de resistencia complejo, conformado por integrantes de ambas familias existentes tanto de transportadores de As(III) como de arsenato reductasas. Debido a esto se condujo al análisis de los distintos elementos que conforman dicho sistema para determinar su participación en la resistencia a As.

- Operón *arsRacrCH*

El término operón fue introducido a inicios de los 60s por Jacob y col. (1960) y utilizado por Jacob y Monod en 1961 para describir al grupo de genes bacterianos adyacentes cuya expresión se encuentra regulada bajo un mismo promotor y las proteínas generadas pertenecen a una misma ruta metabólica. El grupo de genes *arsR₃*, *acr3*, *arsC₂* y *arsH* del genoma de LB400 cumplen con dichas características: son genes adyacentes e inclusive las secuencias de algunos de ellos se superponen (*acr3* y *arsC₂*, 4 pb; *arsC₂* y *arsH*, 1 pb); únicamente se identificó un probable promotor río arriba del extremo 5' de *arsR₃* (**Figura 50**), y además los cuatro genes probablemente participan en la resistencia a As.

Para determinar la participación del grupo de genes denominado *arsRacrCH* en la resistencia a As de LB400, un fragmento de DNA que contiene al grupo fue clonado y transferido a cepas estándar de laboratorio para posteriormente realizar ensayos de susceptibilidad a As(V) y As(III). Inicialmente, el grupo de genes fue transferido a *E. coli* AW3110, cepa cuyo operón cromosómico *arsRBC* fue eliminado (Carlin y col., 1995) por lo cual presenta un fenotipo de sensibilidad a As (**Figura 30**), resultando la primera opción para determinar el funcionamiento del grupo de genes. Los ensayos de As(V) permitieron evaluar la participación de ArsC2 (Arsenato reductasa) mientras que en As(III) se analizó a Acr3 [bomba de expulsión de As(III)]. En las pruebas con As(V), la cepa AW3110 (pUC_*arsRacrCH*) presentó un crecimiento ligeramente mayor comparado a AW3110; sin embargo, el fenotipo fue mucho menor comparado con el control resistente, W3110 (pUCP20). En As(III), AW3110 (pUC_*arsRacrCH*) presentó un crecimiento significativamente mayor comparado con la cepa mutante (**Figura 32**). Estos resultados indican que la bomba de expulsión Acr3 es funcional aunque a un nivel menor (70% aproximadamente) comparada con la bomba ArsB presente en la cepa silvestre W3110, cuya función se intentaba complementar. Se ha propuesto que la eficiencia de los transportadores de As(III) radica en la afinidad que existe por el sustrato; ArsB expulsa As(III) en su forma neutra [As(OH)₃], sin requerir residuos catalíticos, mientras que Acr3 lo hace en su forma ionizada requiriendo residuos de cisteína conservados (Fu y col., 2009). El transportador Acr3 de LB400 carece de algunos de los sitios catalíticos que permiten su interacción con el As(III) dentro de la célula conduciendo a una expulsión menos efectiva comparada con el ArsB de W3110. Este fenómeno se ha observado anteriormente en *Alkaliphilus metalliredigens* (Fu y col., 2009) y *Corynebacterium glutamicum* (Villadangos y col., 2011). Sin embargo, a pesar de la diferencia observada se concluye que LB400 cuenta con un transportador Acr3 funcional que participa en la resistencia a As(III).

Por otra parte, en el análisis de ArsC2 de AW3110 (pUC_*arsRacrCH*) se observó que la proteína presentó una mínima participación en la resistencia a As(V) lo cual llamó la atención al tener en cuenta que LB400 presenta una resistencia relativamente elevada a dicho oxianión (**Figura 32**); por esta razón se continuó con el análisis en *E. coli* JW3470-1, cepa interrumpida en el gen *arsC*, en espera de esclarecer la participación de ArsC2 en la resistencia a As(V). Sin embargo, se obtuvo un resultado inesperado donde JW3470-1 (pUC_*arsRacrCH*) presentó un crecimiento similar a la mutante, indicando un fenotipo de sensibilidad al agente tóxico (**Figura 33A**). Por lo tanto, se concluyó que ArsC2 no es funcional en las cepas de *E. coli* evaluadas.

La actividad de las arsenato reductasas depende de los cofactores glutarredoxina/glutatió o tiorredoxina, dependiendo de la familia que pertenezcan; *E. coli* presenta cuatro isoformas de Grx: Grx1, Grx2, Grx3 y Grx4, las cuales a su vez se clasifican en términos estructurales y propiedades catalíticas, distinguiéndose Grx2 del resto por poseer baja similitud en

secuencia y propiedades cinéticas únicas; su principal función es donar electrones para la reducción del As(V), colaborando con ArsC_{Grx/GSH} (Ye y col., 2014).

Debido a que ArsC2 pertenece a la familia ArsC_{Grx/GSH}, su actividad relativamente baja en AW3110 (**Figura 32**) y JW3470-1 (**Figura 33A**) probablemente se deba a que existe una mínima concentración de Grx2 en el citoplasma de las cepas utilizadas, debido a que predomina alguna de las otras isoformas o, en su caso, la Trx. Se ha reportado que arsenato reductasas de la familia ArsC_{Trx} de *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 expresadas en AW3110 confirieron una resistencia 30 veces mayor a As(V) en la cepa complementada comparada con la mutante (Ordóñez y col., 2005), lo cual señala que la Trx presente en AW3110 permite la función de las ArsC_{Trx}. Debido a esto, se transfirió el plásmido recombinante (pUC_arsRacrCH) a una cepa de una especie filogenéticamente más similar a LB400, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. En los ensayos en As(V), PAO1 (pUC_arsRacrCH) presentó un crecimiento significativamente mayor comparado al control resistente, sin sufrir afectación inclusive a la mayor concentración de As(V) utilizada (15 mM) (**Figura 33B**). De esta forma, se concluyó que ArsC2 es funcional confiriendo un elevado nivel de resistencia a As(V).

Hoy en día existe una gran diversidad de operones *ars* caracterizados (**Tabla 1**), cada uno presentando ciertas peculiaridades estructurales; sin embargo, al referirse a los elementos que regulan la expresión, específicamente al promotor, es más común la presencia de promotores relacionados con el factor σ^{70} de *E. coli*. Como ejemplos están los operones *ars* de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Butcher y col., 2002), *Acidiphilium multivorum* AIU 301 (Suzuki y col., 1998), *Ochrobactrum tritici* SCII24 (Branco y col., 2008), *Synechocystis* sp. (López-Maury y col., 2003) y *E. coli* (Chen y col., 1986) (**Tabla 1**). De igual manera, el análisis *in silico* del grupo de genes en estudio *arsRacrCH* reveló un probable promotor relacionado con el factor σ^{70} (**Figura 50**). El factor σ^{70} , denominado así debido a su peso molecular (70 kDa), también es denominado factor σ primario, vegetativo y/o constitutivo o proteína RpoD; representa el factor responsable de la expresión de la mayoría de los genes esenciales para la célula (Davis y col., 2017). Debido a esto, se propone que el operón *arsRacrCH* de LB400 probablemente se expresa bajo condiciones normales de crecimiento, señalándolo como el participante primario en la resistencia a As en ambientes de baja toxicidad, al no requerir de una condición específica de exposición a As para su expresión. Teniendo en cuenta que el arreglo de genes en operones provee una ventaja en los sistemas de resistencia al coordinar la regulación de genes que codifican proteínas con funciones relacionadas (Salgado y col., 2000).

Al referirse a un operón *ars*, un elemento fundamental es la proteína reguladora ArsR, la cual actúa reprimiendo la expresión del operón (Xu y col., 1996). En la actualidad se conoce a detalle el mecanismo de acción de los reguladores de la familia ArsR (Busenlehner y col., 2003) y los elementos conservados en su estructura. Son esenciales el dominio de unión a DNA, denominado dominio HTH (Gajiwala y Burley, 2000), el cual interacciona con la

región reguladora del operón, y el sitio catalítico, conformado por cuatro Cys conservadas que son las encargadas de la interacción con el As(III) (Kang y col., 2016). Debido a esto se realizó un análisis *in silico* de la proteína ArsR codificada por el grupo de genes *arsRacrCH* con la finalidad de identificar el dominio HTH y el sitio catalítico que presentan los reguladores pertenecientes a la familia SmtB/ArsR; para ello se realizó un alineamiento múltiple de la ArsR de LB400 y algunas ArsR caracterizadas en otras especies bacterianas. Se logró identificar que la ArsR de LB400 cuenta tanto con el dominio HTH como con el dominio catalítico presente en las ArsR caracterizadas; además, se identificó una Cys adicional a las que conforman el sitio catalítico, tanto el ArsR de LB400 como en las ArsR de cepas del orden *Burkholderiales* (**Figura 55**). Por lo tanto, se concluye que la ArsR codificada por el probable operón *arsRacrCH* representa un posible regulador perteneciente a la familia SmtB/ArsR y que por lo tanto debe regular la expresión de los genes adyacentes.

Posteriormente se evaluó la inducción del sistema de resistencia a As de LB400, para lo cual previamente se realizaron cinéticas de crecimiento donde se determinaron las concentraciones tóxicas de As(V) (15 mM) y As(III) (0.5 mM) a utilizar. Como agente inductor se usó la décima parte de la concentración tóxica de cada oxianión. La inducción de los operones *ars* es realizada directamente por As(III), siendo el agente que interacciona con el represor ArsR, generándole un cambio conformacional y con ello provocando su liberación de la región reguladora del operón, permitiendo la interacción con la RNA polimerasa (Shen y col., 2013) (**Figura 5**). Sin embargo, el As(V) también puede activar el sistema, aunque de forma indirecta, ya que primeramente debe ser reducido a As(III) (Wu y Rosen, 1991). Los ensayos de inducción en LB400 mostraron que el sistema de resistencia a As es inducido por concentraciones subinhibitorias tanto de As(V) como de As(III) (**Figuras 57 y 58**). Al comparar los ensayos, se observó que el cultivo inducido con As(III) rápidamente recuperó su crecimiento tras la adición de la concentración tóxica del agente mientras que en el ensayo con As(V), el efecto de inducción se observa tardío; este resultado va en relación a lo descrito anteriormente: el As(V) debe ser primero reducido a As(III) antes de poder inducir el sistema. Entre los operones *ars* descritos existen ejemplos de sistemas inducidos por As(V) y As(III), tales como los pertenecientes a *Bacillus subtilis* (Sato y Kobayashi, 1998), *Desulfovibrio desulfuricans* (Li y Krumholz, 2007), *Campylobacter jejuni* (Wang y col., 2009) y *Corynebacterium glutamicum* (Villadangos y col., 2011).

Por lo tanto, se concluye que el sistema de resistencia a As de LB400 es inducible por los oxianiones As(V) y As(III); sin embargo, no es posible atribuir dicho fenómeno al probable operón *arsRacrCH* considerando que existen genes *arsR*, *arsB* y *arsC* adicionales en el genoma de LB400 que pueden estar respondiendo ante la presencia de dichos oxianiones.

En los resultados discutidos anteriormente se ha señalado al grupo de genes *arsRacrCH* como un operón debido a las características que reúne y a los elementos reguladores que se identificaron en el análisis *in silico* (**Figura 50**), elementos que, como se mencionó anteriormente, son fundamentales para definir a un grupo de genes como operón. Sin

embargo, es necesaria una prueba experimental que permita avalar tal hecho; debido a esto se analizó la co-expresión de las regiones intergénicas *arsR-acr3*, *acr3-arsC₂* y *arsC₂-arsH* mediante ensayos de RT-PCR, utilizando muestras de RNA extraídas de cultivos de LB400 sin inducir y cultivos inducidos con As(III). Antes de evaluar la co-expresión de los genes mencionados se analizó la expresión del gen *arsR* individual con la finalidad de tener un dato preliminar sobre el grupo de genes. En estos ensayos se obtuvo que la expresión de *arsR* es inducida por As(III) (**Figura 59**). La presencia del regulador ArsR, proteína que como se mencionó anteriormente reprime la expresión de los operones *ars* (Wu y Rosen, 191), indica que existe un probable operón *ars* al cual regula. Aunque la expresión de *arsR* representó un dato alentador, cuando se analizó la co-expresión de los demás genes del grupo no fue posible detectar ninguno de los fragmentos esperados en los ensayos de RT-PCR, por lo tanto el denominado operón *arsRacrCH* se designará únicamente como un grupo de genes hasta que exista la prueba experimental rigurosa requerida.

- Gen *arsB*

Las proteínas ArsB son los transportadores de As(III) descritos en los sistemas de resistencia a As más antiguos (Chen y col., 1986; Ji y Silver, 1992). Sin embargo, un análisis filogenético realizado por Yang y col. en 2015 demostró que su presencia en los genomas bacterianos es menor (15.2%) comparado a los transportadores Acr3 (66.5%); y en el caso del orden *Burkholderiales* no se había descrito anteriormente su presencia (Li y col., 2014). Debido a esto resalta la identificación, realizada en este trabajo, de un probable transportador ArsB en el genoma de *B. xenovorans* LB400.

En los ensayos de susceptibilidad a As(III) realizados, se observó que la cepa transformante AW3110 (pUC_*arsB*) presentó un crecimiento mayor comparado a la cepa silvestre; sin embargo, se mantuvo sensible comparada al control resistente W3110 (**Figura 36**). En el caso de la cepa JW3469-1 (pUC_*arsB*), ésta presentó un crecimiento ligeramente mayor comparada a la mutante JW3469-1 pero manteniendo un fenotipo de sensibilidad comparado a la cepa silvestre (**Figura 37**). Estos resultados permiten concluir que ArsB es funcional confiriendo resistencia a As(III) de forma moderada. La diferencia de su participación en la resistencia al oxianión entre ambas mutantes (AW3110 y JW3469-1) probablemente se debe a que ArsB de LB400, siendo una proteína de membrana heteróloga, presenta problemas al anclarse en la membrana interna de las células de *E. coli* debido a las diferencias intrínsecas que presenta con LB400 (Wang y col., 2016).

En el análisis *in silico*, *arsB* presentó un probable promotor relacionado al factor σ^{32} (**Figura 51**). σ^{32} representa el factor de transcripción responsable de la expresión de los genes que codifican a las llamadas proteínas de choque térmico, cuya inducción ocurre por el aumento drástico de temperatura de 30 a 42°C (Potvin y col., 2007). Las proteínas bacterianas de choque térmico, abreviadas HSPs por sus siglas en inglés, corresponden a chaperonas moleculares y proteasas que constituyen el sistema de plegamiento, reparación y degradación

de proteínas (Arséne y col., 1999). Su síntesis se induce después de la exposición a condiciones de estrés que conllevan al desplegamiento de proteínas (Bukau, 1993). El As(III) representa un agente tóxico capaz de afectar la estructura tridimensional de las proteínas, dada su interacción con los grupos sulfhidrilo de los residuos de Cys (Yang y col., 2012), siendo capaz de generar estrés celular; por ello no es de sorprender que los genes de resistencia a As, en este caso *arsB*, presenten un promotor relacionado a σ^{32} . Por esta razón se propone que *arsB* es inducido bajo alguna condición de estrés. Sin embargo, en los ensayos de RT-PCR no se logró detectar la expresión del gen aún en medio con As(III). Teniendo en cuenta que en los ensayos de susceptibilidad a As(III) mencionados anteriormente, ArsB presentó una participación variable en la resistencia al oxianión (**Figuras 36 y 37**), y que además no se logró detectar su expresión con las condiciones ensayadas; se concluye que *arsB* probablemente se expresa a concentraciones muy bajas y que por lo tanto su participación en la resistencia a As(III) es moderada.

Recabando los resultados correspondientes al sistema de resistencia a As(III) de LB400 se concluye que presenta dos transportadores funcionales: un Acr3 y un ArsB, siendo Acr3 el principal participante en la resistencia a As(III). La co-existencia de transportadores de diferentes familias puede deberse a la especificidad que presentan, donde ArsB, como se mencionó anteriormente, además de expulsar As(III) permite también la expulsión de Sb(III) (Maciaszczyk-Dziubinska y col., 2012), confirmando a la bacteria una mayor capacidad de sobrevivir ante los efectos tóxicos de dichos compuestos al presentar un sistema de resistencia más complejo. Un caso similar se ha reportado en las bacterias resistentes a As (As^R) *Rhodopseudomonas palustris* (Qin y col., 2006) y *Herminiimonas arsenicoxydans* (Muller y col., 2007) que de igual manera presentan transportadores de As(III) de ambas familias ArsB y Acr3.

- Gen *arsC1*

Los genes *arsC*, además de formar parte de operones *ars*, es común encontrarlos dispersos en los genomas bacterianos inclusive en más de una copia (Li y col., 2014); esta situación ocurre en LB400 donde se identificaron tres genes *arsC* adicionales al gen *arsC2* del operón (*arsC1*, *arsC3* y *arsC4*) (**Tabla 4**). La participación de *arsC1*, que codifica a ArsC1, una probable arsenato reductasa perteneciente a la familia $ArsC_{Grx/GSH}$ (**Figura 27**) en la resistencia a As(V) fue evaluada en las mutantes de *E. coli* AW3110 (**Figura 40**) y JW3470-1 (**Figura 41A**), y en *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 41B**). En los tres casos las cepas transformantes presentaron un crecimiento similar al control sensible, presentando un fenotipo de sensibilidad a As(V), lo cual permitió concluir que ArsC1 no es funcional bajo las condiciones ensayadas. Al pertenecer a la misma familia $ArsC_{Grx/GSH}$ que ArsC2 (ArsC del operón) se esperaba que ArsC1 fuera funcional en la cepa PAO1 tal como ocurrió con aquella (**Figura 33B**); sin embargo, no fue así (**Figura 41B**).

En el análisis *in silico* de *arsC₁* se identificó un probable promotor relacionado con el factor σ^{32} (**Figura 52**), similar a lo ocurrido con el gen *arsB* (**Figura 51**). Como se mencionó anteriormente, el factor σ^{32} participa en la expresión de proteínas bajo condiciones de estrés, ambiente que puede ser generado por la presencia de As(III). En el caso de los ensayos de RT-PCR, se obtuvo la amplificación del gen *arsC₁* a partir del RNA extraído de un medio con As(III) (**Figura 60**), lo cual indica que la expresión de *arsC₁* se induce por la presencia de As(III). El gen *arsC₁* respondió a la presencia del oxianión, sin embargo, la proteína codificada ArsC1 no participó en la resistencia a As(V) (**Figuras 40 y 41**), lo cual permite proponer que probablemente ArsC1 tiene una participación mínima en el sistema de resistencia de LB400, actuando en concentraciones muy bajas de As(V).

- Gen *arsC₃*

De las cuatro arsenato reductasas de LB400 obtenidas en el análisis filogenético, ArsC3 codificada por el gen *arsC₃* representa la única enzima de la familia ArsC_{Trx} (**Figura 27**), por lo cual para llevar a cabo la reducción del As(V) a As(III) requiere del cofactor Trx (Mukhopadhyay y col., 2002). La versatilidad de las enzimas Trxs radica en la presencia de dos Cys libres en su sitio catalítico, las cuales pueden interaccionar fácilmente con otras moléculas (Roos y col., 2009). En las ArsC bacterianas, propiamente en la reducción del As(V) a As(III), participan las Trx reduciendo a la ArsC_{Trx}, que queda oxidada después de su interacción con el As(V), regenerando a la enzima (Messens y Silver, 2006). La expresión heteróloga de ArsC_{Trx} en cepas de *E. coli* ha sido exitosa confiriendo resistencia a As(V), teniendo como ejemplos genes *arsC_{Trx}* de *Thiobacillus ferrooxidans* (Butcher y col., 2000) y *Bacillus* sp. (Bhat y col., 2011). Sin embargo, en el caso de la ArsC3 de LB400 no se observó su participación en la resistencia a As(V) en las mutantes de *E. coli* AW3110 (**Figura 44**) y JW3470-1 (**Figura 45A**) ni en *P. aeruginosa* PAO1 (**Figura 45B**).

El análisis *in silico* de *arsC₃* reveló la presencia de un probable promotor relacionado con el factor σ^{32} (**Figura 53**). Este factor transcripcional, como se mencionó anteriormente, es responsable de la expresión de proteínas de choque térmico bajo una condición de estrés (Potvin y col., 2006). En el caso de los ensayos de RT-PCR, se detectó una ligera expresión del gen tanto en cultivos no inducidos como inducidos con As(III) (**Figura 61**), indicando que el gen *arsC₃* se expresa de forma constitutiva sin depender de la presencia del As(III). Los genes constitutivos son aquellos que la célula expresa continuamente durante condiciones normales de crecimiento siendo esenciales para la sobrevivencia de la bacteria (Paték y col., 2013). La expresión detectada de ArsC3 es baja, razón por la cual probablemente no fue la suficiente para conferir resistencia a As(V); sin embargo, ArsC3 puede estar actuando como un activador indirecto al proporcionar el As(III) para la inducción del probable operón *arsRacrCH*, sistema que confiere el mayor nivel de resistencia a As (**Figuras 32B y 33B**). Existe evidencia experimental de Arsenato reductasas constitutivas cuya participación en la resistencia a As radica en reducir el As(V) a As(III) para que éste active operones *ars*; tal es el caso de *Desulfovibrio desulfuricans* (Li y Krumholz, 2007),

Geobacillus kaustophilus (Cuebas y col., 2011) y *Corynebacterium glutamicum* (Villadangos y col., 2011).

- Gen *arsC4*

La arsenato reductasa *ArsC4* de LB400 fue clasificada en el análisis filogenético como *ArsC_{Grx/GSH}* (**Figura 27**). Los ensayos anteriores con *ArsC1* y *ArsC2* han señalado que la expresión heteróloga de estas enzimas en las mutantes de *E. coli* AW3110 (**Figura 32 y 40**) y JW3470-1 no ha sido eficiente (**Figura 33A y 41A**), probablemente por los requerimientos de cofactores Grx y GSH, como se explicó anteriormente. En cambio, la participación de *ArsC2* en la resistencia As(V) fue esclarecida en la cepa *P. aeruginosa* PAO1 probablemente debido a la cercanía filogenética con *B. xenovorans* LB400 (Goris y col., 2004). Sin embargo, *ArsC4* presentó un comportamiento diferente a lo observado en las *ArsC_{Grx/GSH}* analizadas anteriormente, confiriendo una ligera resistencia a As(V) en la mutante JW3470-1 (**Figura 49A**) mientras que en AW3110 (**Figura 48**) y PAO1 (**Figura 49B**) no participó en la resistencia al oxianión.

El análisis *in silico* de *arsC4* indicó que el gen presenta un probable promotor σ^{32} (**Figura 54**), factor sigma que, como se ha mencionado anteriormente, está relacionado los genes que se expresan bajo alguna condición de estrés (Potvin y col., 2006). En los ensayos de expresión de *arsC4* se observó que la expresión se detecta en un nivel relativamente bajo en cultivos sin inducir y que aumenta en cultivos inducidos con As(III) (**Figura 62**), concluyendo que *arsC4* es un gen cuya expresión se induce en respuesta a As(III).

De forma similar a lo comentado anteriormente en el caso de *ArsC1* y *ArsC3*, el papel de *ArsC4* en el sistema de resistencia a As de LB400 también puede ser la activación indirecta del probable operón *arsRacrCH* mediante la reducción del As(V) y no directamente el de conferir resistencia a concentraciones elevadas del oxianión; modelos de este tipo se han propuesto en organismos como *Desulfovibrio desulfuricans* (Li y Krumholz, 2007), *Geobacillus kaustophilus* (Cuebas y col., 2011) y *Corynebacterium glutamicum* (Villadangos y col., 2011).

Del análisis del sistema de resistencia a As(V) se concluye que *B. xenovorans* LB400 cuenta con cuatro arsenato reductasas: *ArsC1*, *ArsC2*, *ArsC3* y *ArsC4*, cada una ejerciendo un papel diferente en el sistema de resistencia a As(V). *ArsC1* no fue funcional, sin embargo, el gen *arsC1* se expresó en presencia de As(III); *ArsC2* presente en el probable operón, se señala como la principal proteína que reduce el As(V) a As(III) confiriendo resistencia; *ArsC3* no fue funcional y el gen *arsC3* se expresó en un nivel basal en ausencia y presencia del oxianión; finalmente, *ArsC4*, cuyo gen se expresó en presencia de As(III), confirió moderada resistencia a As(V). Por lo tanto, se concluye que las arsenato reductasas *ArsC1*, *ArsC3* y *ArsC4* son las encargadas de reducir concentraciones relativamente bajas del As(V) que ingresa a la célula para generar el As(III) requerido para activar la expresión del probable

operón *arsRacrCH* el cual codifica a la arsenato reductasa ArsC2, partícipe principal en la resistencia a As(V).

Con los resultados comentados anteriormente se concluye que *B. xenovorans* LB400 cuenta con un sistema complejo de resistencia a As, conformado por un grupo de proteínas que participan en la resistencia a bajas concentraciones de As(V) y As(III) (ArsB, ArsC1, ArsC3 y ArsC4) y un sistema con mayor eficiencia que le confiere resistencia a concentraciones elevadas de ambos oxianiones (Acr3 y ArsC2).

Por lo tanto se propone un modelo hipotético del sistema de resistencia a As de LB400 esquematizado en la **Figura 63**. Una vez dentro de la célula, el As(V) es reducido a As(III) en primera instancia por la arsenato reductasa ArsC3, la cual se expresa de forma constitutiva. El As(III) generado conduce a la inducción de la expresión de las arsenato reductasas ArsC1 y ArsC4, las cuales son partícipes de la reducción del As(V) en bajas concentraciones. El As(III) generado por las tres arsenato reductasas, así como el que ingresa a las células directamente, es expulsado a través de la bomba ArsB, la cual es eficiente en bajas concentraciones de As(III). Cuando la concentración de As(III) dentro de la célula aumenta, éste conduce a la desrepresión del probable operon *arsRacrCH*, al interaccionar con la proteína represora ArsR. El operón *arsRacrCH* codifica la arsenato reductasa ArsC2 y la bomba de expulsión de As(III) Acr3, partícipes principales en la resistencia a As(V) y As(III), respectivamente, en concentraciones elevadas de ambos oxianiones.

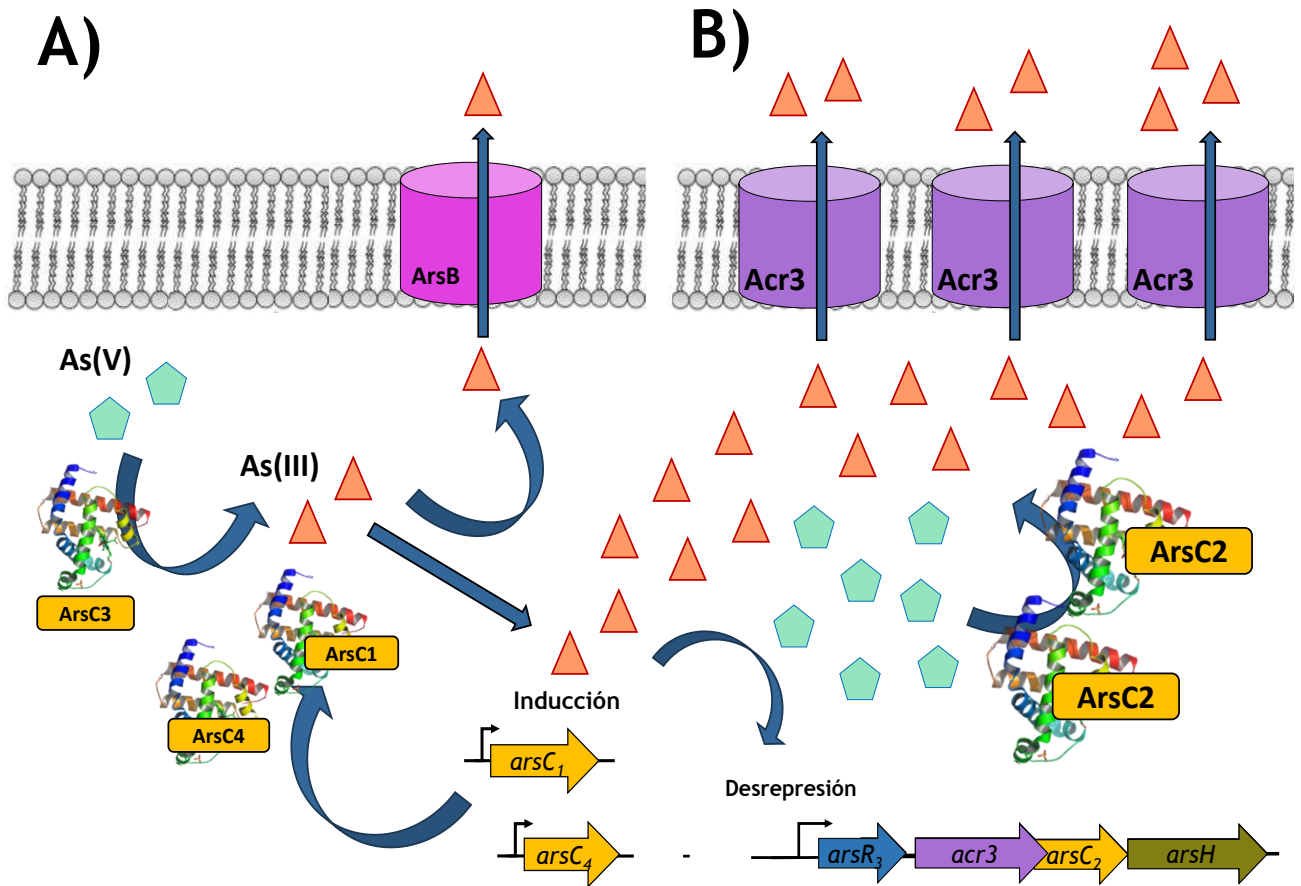


Figura 63. Modelo hipotético del sistema de resistencia a As de *B. xenovorans* LB400.

Se muestra el As(V) (pentágonos) y As(III) (triángulos) dentro de la célula donde (A), en bajas concentraciones de As(V) y As(III) participan las arsenato reductas ArsC1, ArsC3 y ArsC4 y la bomba de expulsión de As(III) ArsB, y (B) en concentraciones elevadas de ambos oxianiones, el operón *arsRacrCH* se desreprime y codifica a la arsenato reductas ArsC2 y la bomba de expulsión Acr3, principales proteínas del sistema de resistencia. El funcionamiento del sistema se describe en el texto.

XII. CONCLUSIÓN

Los genes *arsR*, *acr3* y *arsC₂*, del probable operón, y los genes individuales *arsB*, *arsC₁*, *arsC₃* y *arsC₄* de *B. xenovorans* LB400 participan de forma diferencial en la resistencia a las oxianiones de Arsénico.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aaltonen, K. J. y Silow, M. (2012) Transmembrane topology of the Acr3 family arsenite transporter from *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 963-973.
2. Achour-Rokbani, A., Bauda, P. y Billard, P. (2007) Diversity of arsenite transporter genes from arsenic-resistant soil bacteria. *Res. Microbiol.* 158: 128-137.
3. Acosta-Navarrete, Y. M., León-Márquez Y. L., Salinas-Herrera, K., Jácome-Galarza, I. E., Meza-Carmen, V., Ramírez-Díaz, M. I., y Cervantes, C. (2014) Expression of the six chromate ion transporter homologues of *Burkholderia xenovorans* LB400. *Microbiology* 160: 287-295.
4. Aguilar-Barajas E., Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, H. y Cervantes, C. (2010) Heavy metal resistance in Pseudomonads. En: Ramos, J. y Filloux, A. (Eds.). *Pseudomonas*, Volumen 6, Springer, pp. 255-282.
5. Arsène, F., Tomoyasu, T., Mogk, A., Schirra, C., Schulze-Specking, A., y Bukau, B. (1999) Role of region C in regulation of the heat shock gene-specific sigma factor of *Escherichia coli*, σ^{32} . *J. Bacteriol.* 181: 3552-3561.
6. Åslund, F. y Beckwith, J. (1999) The thioredoxin superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. *J. Bacteriol.* 181: 1375-1379.
7. Bedard, D., L., Unterman, R., Bopp, L., Brennan, M.J., Haberl, M. L. y Johnson, C. (1986) Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 761-768.
8. Bennett, M., Guan, Z., Laurberg, M. y Su, X.D. (2001) *Bacillus subtilis* arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 13577-13582.
9. Bhat, M. A., Tsuda, M., Horiike, K., Nozaki, M., Vaidyanathan, C. S. y Nakazawa, T. (1994) Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2:4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 307-312.
10. Bhat, S., Luo, X., Xu, Z., Liu, L. y Zhang, R. (2011) *Bacillus* sp. CDB3 isolated from cattle dip-sites possesses two *ars* gene clusters. *J. Environ. Sci.* 23: 95-101.
11. Bienert, G. P., Schüssler, M. D. y Jahn, T. P. (2007) Metalloids: essential, beneficial or toxic? major intrinsic proteins sort it out. *Trends Biochem. Sci.* 33: 20-26.
12. Birnboim, H. C. y Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
13. Bobrowicz, P., Wysocki, R., Owsianik, G., Goffeau, A. y Ulaszewski, S. (1997) Isolation of three contiguous genes, *ACR1*, *ACR2* and *ACR3*, involved in resistance to arsenic compounds in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13: 819-828.
14. Branco, R., Chung, A. P. y Morais, P. V. (2008) Sequencing and expression of two arsenic resistance operons with different functions in the highly arsenic-resistant strain *Ochrobactrum tritici* SCII24T. *BMC Microbiol.* 8: 95.
15. Bukau, B. (1993) Regulation of the *E. coli* heat shock response. *Mol. Microbiol.* 9: 671-680.
16. Burkholder, W. H. (1948) Bacteria as plant pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 2: 389-412.
17. Busenlehner, L. S., Pennella, M. A. y Giedroc, D. P. (2003) The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 131-143.

18. Butcher, B. G., Deane, S. M. y Rawlings, D. E. (2000) The chromosomal arsenic resistance genes of *Thiobacillus ferrooxidans* have an unusual arrangement and confer increased arsenic and antimony resistance to *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1826-1833.
19. Butcher, B.G. y Rawlings, D. E. (2002) The divergent chromosomal *ars* operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is regulated by an atypical ArsR protein. *Microbiology* 148: 3983-3992.
20. Cai, J., Salmon, K. y DuBow, M. S. (1998) A chromosomal *ars* operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiology* 144: 2705-2713.
21. Carlin, A., Shi, W., Dey, S. y Rosen, R. P. (1995) The *ars* operon of *Escherichia coli* confers arsenical and antimonial resistance. *J. Bacteriol.* 177: 981-986.
22. Cervantes, C., Ji, G., Ramírez, J. L. y Silver, S. (1994) Resistance to arsenic compounds in microorganisms. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 15: 355-367.
23. Chain, P.S.G., Deneff, V.J., Konstantinidis, K.T., Vergez, L.M., Agulló, L., Latorre-Reyes, V., Hauser, L., Córdova, M., Gómez, L., González, M., Land, M., Lao, V., Larimer, F., LiPuma, J.J., Mahenthiralingam, E., Malfatti, S.A., Marx, C.J., Parnell, J. J., Ramette, A., Richardson, P., Seeger, M., Smith, D., Spilker, T., Jun Sul, W., Tsoi, T.V., Ulrich, L.E., Zhulin, I.B. y Tiedje, J.M. (2006) *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15280-15287.
24. Chen, C. M., Misra, T. K., Silver, S. y Rosen, B. P. (1986) Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Biol. Chem.* 261: 15030-15038.
25. Chen, J., Yoshinaga, M., Garbinski, L. D. y Rosen, B. P. (2016) Synergistic interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and ArsJ, a novel organoarsenical efflux permease, confers arsenate resistance. *Mol. Microbiol.* 100: 945-953.
26. Chen, Y., Dey, S. y Rosen, B. P. (1996) Soft metal thiol chemistry is not involved in the transport of arsenite by the Ars pump. *J. Bacteriol.* 178: 911-913.
27. Cuebas, M., Villafane, A., McBride, M., Yee, N. y Bini, E. (2011) Arsenate reduction and expression of multiple chromosomal *ars* operons in *Geobacillus kaustophilus* A1. *Microbiology* 157: 2004-2011.
28. Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A. y MacLellan, S. R. (2017) The essential activities of the bacterial sigma factor. *Can. J. Microbiol.* 63: 89-99.
29. Deneff, V. J., Klappenbach, J. A., Patrauchan, M. A., Florizone, C., Rodrigues, J. L. M., Tsoi, T. V., Verstraete, W., Eltis, L. D. y Tiedje, J. M. (2006) Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 585-595.
30. Dey, S., Dou, D. y Rosen, B. P. (1994) ATP-dependent arsenite transport in everted membrane vesicles of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 269: 25442-25446.
31. Díaz-Pérez C., Cervantes C., Campos-García J., Julián-Sánchez A., Riveros-Rosas H. (2007) Phylogenetic analysis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. *FEBS J.* 23: 6215-6227.
32. Dilda, P. J. y Hogg, P. J. (2007) Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat. Rev.* 33: 542-564.

33. Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R. y DuBow, M. S. (1995) An *Escherichia coli* chromosomal *ars* operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 177: 2050-2056.
34. Drewniak, L., Dziewit, L., Cieczkowska, M., Gawor, J., Gromadka, R. y Sklodowska, A. (2013) Structural and functional genomics of plasmid pSinA of *Sinorhizobium* sp. M14 encoding genes for the arsenite oxidation and arsenic resistance. *J. Biotechnol.* 164: 479-488.
35. Drobna, Z., Walton, F. S., Harmon, A. W., Thomas, D. J. y Stýblo, M. (2010) Interspecies differences in metabolism of arsenic by cultured primary hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245: 47-56.
36. Dubnau, D. (1993) Genetic exchange and homologous recombination. En: Sonenshein, A., Hoch, J. y Losick, R. (Eds.). *Bacillus subtilis* and Other Gram-positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics, ASM Press, pp. 555–584.
37. Enderle, P. J. y Farwell, M. A. (1988) Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* 25: 955-958.
38. Estrada-de los Santos, P., Rojas-Rojas, F. U., Tapia-García, E. Y., Vásquez-Murrieta, M. S. y Hirsch, A. M. (2015) To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. *Ann. Microbiol.* 66: 1303-1314.
39. Fauman, E. B., Cogswell, J. P., Lovejoy, B., Rocque, W. J., Holmes, W., Montana, V. G., Piwnica-Worms, H., Rink, M. J. y Saper, M. A. (1998) Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell* 93: 617-625.
40. Friedheim, E. A. H. (1949) Mel B in the treatment of human trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med.* 29: 173–180.
41. Fu, H.L., Meng, Y., Ordóñez, E., Villadangos, A. F., Bhattacharjee, H., Gil, J. A., Maetos, L. M. y Rosen, B. P. (2009) Properties of arsenite efflux permeases (Acr3) from *Alkaliphilus metalliredigens* and *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biol. Chem.* 284: 19887-19895.
42. Gajiwala, K. S. y Burley, S. K. (2000) Winged helix proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 110–116.
43. Gihring, T. M., Bond, P. L., Peters, S. C. y Banfield, J. F. (2003) Arsenic resistance in the archaeon "*Ferroplasma acidarmanus*": new insights into the structure and evolution of the *ars* genes. *Extremophiles* 7: 123-130.
44. González, P. G., Mondragon, J. V. y Velázquez-Fernández, J. (2013) Oxidación del Arsénico regulada por un sistema bacteriano de dos componentes. *Revista Bio Ciencias* 2: 92-97.
45. Goris, J., De Vos, P., Caballero-Mellado, J., Park, J., Falsen, E., Quensen III, J. F., Tiedje, J. M. y Vandame, P. (2004) Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int. J. Syst. Microbiol.* 54: 1677-1681.
46. Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B. L. y otros autores (2006) Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol. Syst. Biol.* 2: 0007.
47. Hedges, R. W. y Baumberg S. (1973) Resistance to arsenic compounds conferred by a plasmid transmissible between strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 115: 459-460.
48. Holloway, B. W., Krishnapillai, V. & Morgan, A. F. (1979) Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiol. Rev.* 43:73–102.

49. Holmgren A. (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* 15: 239-243.
50. Ish-Horowicz, D. y Burke, JF. (1982) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 9: 2989-2998.
51. Jacob, F., Perrin, D., Sánchez, C. y Monod, J. (1960) L'opéron: groupe de gènes à expression cordonnée par un opérateur. *C. R. Acad. Sci. Paris* 250: 1727-1730.
52. Jacob, F. y Monod, J. (1960) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-356.
53. Ji, G. y Silver, S. (1992) Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* 174: 3684-3694.
54. Jiang, H., Liang, Y., Yin, H., Xiao, Y., Guo, X., Xu, Y., Hu, Q. y Liu, H. (2015) Effects of arsenite resistance on the growth and functional gene expression of *Leptospirillum ferriphilum* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in pure culture and coculture. *Biomed. Res. Int.* 2015: 1-13.
55. Kang, YS., Brame, K., Jetter, J., Bothner, B. B., Wang, G., Thiyagarajan, S. y McDermotta, T. R. (2016) Regulatory activities of four ArsR proteins in *Agrobacterium tumefaciens* 5A. *Appl. Environ. Microb.* 86: 3471-3480.
56. Klaassen, CD. (1996) Heavy metals and heavy-metal antagonists. En: Hardman, J. G., Gilman, A.G. y Limbird, L.E. (Eds.). *The pharmacological basis of therapeutics*, McGraw-Hill, pp. 639-647.
57. Kormas, K. A. (2011) Interpreting diversity of Proteobacteria based on 16S rRNA gene copy number. En: NovaPublisher. *Proteobacteria: Phylogeny, Metabolic Diversity and Ecological Effects*, M. L. Sezena, pp. 73-89.
58. Kwong, YL. y Todd, D. (1997) Delicious poison: arsenic trioxide for the treatment of leukemia. *Blood* 89: 3487-3488.
59. León-Márquez Y. L. (2009) Clonación y expresión funcional de proteínas de la familia LCHR. Tesis de maestría en Biología experimental. IIQB-UMSH.
60. Lessie, T. G., Hendrickson, W., Manning, B. D. y Devereux, R. (1996) Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 144: 117-128.
61. Li, X. y Krumholz, L. R. (2007) Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an *arsRBCC* operon and an *arsC* Gene. *J. Bacteriol.* 189: 3705-3711.
62. Li, X., Zhang, L. y Wang, G. (2014) Genomic evidence reveals the extreme diversity and wide distribution of the arsenic-related genes in *Burkholderiales*. *PLOS ONE* 9: 1-11.
63. Lin, Y. F., Walmsley, A. R. y Rosen, B. P. (2006) An arsenic metallochaperone for an arsenic detoxification pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15617-15622.
64. Line, M. A. (2002) The enigma of the origin of life and its timing. *Microbiology* 148: 21-27.
65. Lloyd, N. C., Morgan, H. W., Nicholson, B. K. y Ronimus, R. S. (2005) The composition of Ehrlich's salvarsan: resolution of a century old debate. *Angew. Chem. Int. Edit.* 44: 941-944.
66. López-Maury, L., Florencio, F. J. y Reyes, J. C. (2003) Arsenic sensing and resistance system in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Bacteriol.* 185: 5363-5371.
67. Ma, J. F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y. y Yano, M. (2007) An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448: 209-212.

68. Maciaszczyk-Dziubinska, E., Wawrzycka, D. y Wysocki, R. (2012) Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 3527-3548.
69. Mansour, N. M., Sawhney, M., Tamang, D. G., Vogl, C. y Saier, M. H. (2007) The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily. *FEBS J.* 274: 612-629.
70. Martin, P., DeMel, S., Shi, J., Gladysheva, T., Gatti, D. L., Rosen, B. P. y Edwards, F. P. (2001) Insights into the structure, solvation, and mechanism of ArsC arsenate reductase, a novel arsenic detoxification enzyme. *Structure* 9: 1071-1081.
71. McLeod, M. P., Warren, R. L., Hsiao, W. L., Araki, N., Myhre, M., Fernandes, C., Miyazawa, D., Wong, W., Lillquist, A. L., Wang, D., Dosanjh, M., Hara, H., Petrescu, A., Morin, R. D., Yang, G., Stott, J. M., Schein, J. E., Shin, H., Smailus, D., Siddiqui, A. S., Marra, M. A., Jones, J. M., Holt, R., Brinkman, S. L., Miyauchi, K., Fukuda, M., Davies, J. E., Mohn, W. W. y Eltis, L. D. (2006) The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15582-15587.
72. Mendonça, A. G., Alves, R. J. y Pereira-Leal, J. B. (2011) Loss of genetic redundancy in reductive genome evolution. *PLOS ONE* 7: 1-10.
73. Messens, J., Martins, J. C., Van-Belle, K., Brosens, E., Desmyter, A., De-Gieter, M., Wieruszkeski, JM., Willem, R., Wyns, L. y Zegers, I. (2002) All intermediates of the arsenate reductase mechanism, including an intramolecular dynamic disulfide cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8506-8511.
74. Messens, J. y Silver, S. (2006) Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J. Mol. Biol.* 362: 1-17.
75. Mishra, S., Alfeld, M., Sobotka, R., Andresen, E., Falkenberg, G. y Küpper, H. (2016) Analysis of sublethal arsenic toxicity to *Ceratophyllum demersum*: subcellular distribution of arsenic and inhibition of chlorophyll biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 67: 4639–4646.
76. Mukhopadhyay, R. y Rosen, B. P. (2002) Arsenate reductases in prokaryotes and eukaryotes. *Environ. Health Persp.* 110: 745-748.
77. Mukhopadhyay, R., Bhattacharjee, H. y Rosen, B.P. (2014) Aquaglyceroporins: generalized metalloid channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1840: 1583-1591.
78. Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Phung, L. T. y Silver, S. (2002) Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 311-325.
79. Mukhopadhyay, R., Shi, J. y Rosen, B. P. (2000) Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. *J. Biol. Chem.* 28: 21149-21157.
80. Muller, D., Médigue, C., Koechler, S., Barbe, V., Barakat, M., Talla, E., Bonnefoy, V., Krin, E., Arsène-Ploetze, F., Carapito, C., Chandler, M., Cournoyer, B., Cruveiller, S., Dossat, C., Duval, S., Heymann, M., Leize, E., Lieutaud, A., Lièvremon, D., Makita, Y., Mangenot, S., Nitschke, W., Ortet, P., Perdrial, N., Schoepp, B., Siguier, P., Simeonova, DD., Rouy, Z., Segurens, B., Turlin, E., Vallenet, D., Van Dorselaer, A., Weiss, S., Weissenbach, J., Lett, MC., Danchin, A. y Bertin, PN. (2007) A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLOS Genetics* 3e53.
81. Neyt, C., Iriarte, M., Thi, V. H. y Cornelis, G. R. (1997) Virulence and arsenic resistance in *Yersinia*. *J. Bacteriol.* 179: 612-619.
82. Novick, R.P. y Roth, C. (1968) Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 95: 1335-1342.

83. Ordóñez, E., Letek, M., Valbuena, N., Gil, J. A. y Mateos, L. M. (2005) Analysis of genes involved in arsenic resistance in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6206-6215.
84. Oremland, R. S., Saltikov, C. W., Wolfe-Simon, F. y Stolz, J. F. (2009) Arsenic in the evolution of earth and extraterrestrial ecosystems. *Geomicrobiol. J.* 26:522-536.
85. Osman, D. y Cavet, J. S. (2010) Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors. *Nat. Prod. Rep.* 27: 668-680.
86. Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G. y de Lorenzo, V. (2015) Functional coexistence of twin arsenic resistance systems in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 17: 229-238.
87. Pandey, J., Heipieper, H. J., Chauhan, A., Arora, P. K., Prakash, D., Takeo, M. y Jain, R. K. (2011) Reductive dehalogenation mediated initiation of aerobic degradation of 2-chloro-4-nitrophenol (2C4NP) by *Burkholderia* sp. strain SJ98. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92: 597-607.
88. Pátek, M., Holátko, J., Busche, T., Kalinowski, J. y Nešvera, J. (2013) *Corynebacterium glutamicum* promoters: a practical approach. *Microbial Biotechnology* 6: 103–117.
89. Peyru, G., Wexler, L. y Novick, P. R. (1969) Naturally occurring penicillinase plasmid in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 98: 215-221.
90. Potvin, E., Sanschagrin, F. y Levesque, R. C. (2007) Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 38–55.
91. Prakash, S., Cooper, G., Singhi, S. y Saier, M. H. (2003) The ion transporter superfamily. *Biochim. Biophys. Acta* 1618: 79-92.
92. Prithivirajsingh, Mishra, S. K. y Mahadevan, A. (2001) Detection and analysis of chromosomal arsenic resistance in *Pseudomonas fluorescens* strain MSP3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1393-1401.
93. Qin, J., Rosen, B. P., Zhang, Y., Wang, G., Franke, S. y Rensing, C. (2006) Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 2075-2080.
94. Rangel, M. E. A., Montañez, H. L. E., Luévanos, M. P. y Balagurusamy, N. (2015) Impact of arsenic on the environment and its microbial transformation. *Terra Latinoamer.* 33: 103-118.
95. Reyes-Gallegos, R. I., Ramírez-Díaz, M. I. y Cervantes, C. (2016) *chr* genes from adaptive replicons are responsible for chromate resistance by *Burkholderia xenovorans* LB400. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 1-5.
96. Roos, G., Foloppe, N., Van Laer, K., Wyns, L., Nilsson, L., Geerlings, P. y Messens, J. (2009) How thioredoxin dissociates its mixed disulfide. *PLOS ONE* 5: 1-15.
97. Rosen, B. P. (1999a) Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol.* 7: 207-212.
98. Rosen, B. P. (1999b) The role of efflux in bacterial resistance to soft metals and metalloids. *Essays Biochem.* 34:1-15.
99. Rosen, B. P., Hsu, C. M., Karkaria, C. E., Owolabi, J. B. y Tisa, L. S. (1990) Molecular analysis of an ATP-dependent anion pump. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 326: 455-463.
100. Rosen, B. P. y Liu, Z. (2009) Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview. *Environ. Int.* 35: 512-515.
101. Rothstein, A. y Donovan, K. (1963) Interactions of arsenate with the phosphate-transporting system of yeast. *J. Gen. Physiol.* 46: 1075-1085.
102. Ryan, D. y Colleran, E. (2002) Arsenical resistance in the IncHI2 plasmids. *Plasmid* 47: 234-240.

103. Salgado-Lora, M. G. (2017) Análisis de la función del operón *arsRacr3C* de *Burkholderia xenovorans* LB400. Tesis de licenciatura. QFB-UMSNH.
104. Salgado, H., Moreno-Hagelsieb, G., Smith, T. F. y Collado-Vides, J. (2000) Operons in *Escherichia coli*: Genomic analyses and predictions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6652-6657.
105. Saltikov, C.W., Cifuentes, A., Venkateswaran, K. y Newman, D. K. (2003) The *ars* detoxification system is advantageous but not required for As(V) respiration by the genetically tractable *Shewanella* species strain ANA-3. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2800-2809.
106. Sánchez-Pérez, G., Mira, A., Nyirö, G., Pasic, L. y Rodríguez-Valera, F. (2008) Adapting to environmental changes using specialized paralogs. *Trends Genet.* 24: 154-158.
107. Sanders, O. I., Rensing, C., Kuroda, M., Mitra, B. y Rosen, B. P. (1997) Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 3365-3367.
108. Sato, T. y Kobayashi, Y. (1998) The *ars* operon in the skin element of *Bacillus subtilis* confers resistance to arsenate and arsenite. *J. Bacteriol.* 180: 1655-1661.
109. Serrato-Gamiño, N. y Cervantes, C. (2017) Diversidad de genes de resistencia a arsénico en procariontas. *Ciencia Nicolaita* 70: 80-93.
110. Shen, S., Li, X.F., Cullen, W. R., Weinfeld, M. y Le, X. C. (2013) Arsenic binding to proteins. *Chem. Rev.* 113: 7769–7792.
111. Shen, Z., Luangtongkum, T., Qiang, Z., Jeon, B., Wang, L. y Zhang, Q. (2014) Identification of a novel membrane transporter mediating resistance to organic arsenic in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 2021-2029.
112. Shen, ZX., Chen, GQ., Ni, JH., Li, XS., Xiong, SM., Qiu, QY., Zhu, J., Tang, W., Sun, GL., Yang, KQ., Chen, Y., Zhou, L., Fang, ZW., Wang, YT., Ma, J., Zhang, P., Zhang, TD., Chen, SJ., Chen, Z. y Wang, ZY. (1997) Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 89: 3354–3360.
113. Suárez-Moreno, Z. R., Caballero-Mellado, J. y Venturi, V. (2008) The new group of non-pathogenic plant-associated nitrogen-fixing *Burkholderia* spp. shares a conserved quorum-sensing system, which is tightly regulated. *Microbiology* 154: 2048-2059.
114. Suzuki, K., Wakao, N., Kimura, T., Sakka, K. y Ohmiya, K. (1998) Expression and regulation of the arsenic resistance operon of *Acidiphilium multivorum* AIU 301 plasmid pKW301 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 411-418.
115. Tripathi, RD., Singh, R., Tripathi, P., Dwivedi, S., Chauhan, R., Adhikari, B. y Trivedi, P. K. (2014) Arsenic accumulation and tolerance in rootless macrophyte *Najas indica* are mediated through antioxidants, amino acids and phytochelatins. *Aquat. Toxicol.* 157: 70-80.
116. Tuffin, I.M., de Groot, P., Deane, S. M. y Rawlings, D. E. (2005) An unusual Tn21-like transposon containing an *ars* operon is present in highly arsenic-resistant strains of the biomining bacterium *Acidithiobacillus caldus*. *Microbiology* 151: 3027-3039.
117. Veeraraghavan, B., Devanga-Ragupathi, N. K., Muthuirulandi-Sethuvel, D. P. y Hadibasha, N. (2016) Azithromycin resistant *Salmonella Typhi* isolated from blood. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 239-245.
118. Villadangos, A. F., Fu, HL., Gil, J. A., Messens, J., Rosen, B. P. y Mateos, L. M. (2011) Efflux permease CgAcr3-1 of *Corynebacterium glutamicum* is an arsenite-specific antiporter. *J. Biol. Chem.* 287: 723-735.

119. Voronina, O. L., Kunda, M. S., Ryzhova, N. N., Aksenova, E. I., Semenov, A. N., Lasareva, A. V., Amelina, E. L., Chuchalin, A. G., Lunin, V. G. y Gintsburg, A. L. (2014) The variability of the order Burkholderiales representatives in the healthcare units. *Biomed. Res. Int.* 2015: 1-9.
120. Wang, G., Kennedy, S. P., Fasiludeen, S., Rensing, C. y DasSarma, S. (2004) Arsenic resistance in *Halobacterium* sp. strain NRC-1 examined by using an improved gene knockout system. *J. Bacteriol.* 186: 3187-3194.
121. Wang, L., Chen, S., Xiao, X., Huang, X., You, D., Zhou, X. y Deng, Z. (2006) *arsRBOCT* arsenic resistance system encoded by linear plasmid pHZ227 in *Streptomyces* sp. strain FR-008. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3738-3742.
122. Wang, L., Jeon, B., Sahin, O. y Zhang, Q. (2009) Identification of an arsenic resistance and arsenic-sensing system in *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 5064-5073.
123. Wang, L., Zhuang, X., Zhuang, G. y Jing, C. (2016) Arsenic resistance strategy in *Pantoea* sp. IMH: Organization, function and evolution of *ars* genes. *Nature* 6: 39195-39204.
124. West S. E., Schweizer H. P., Dall C., Sample A. K., Runyen-Janecky L. J. (1994) Construction of improved *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 and sequence of the region required for their replication in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 128: 51-56.
125. Wu, J., Tisa, L. S. y Rosen, B. P. (1991) Membrane topology of the ArsB protein, the membrane subunit of an anion-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 267: 12570-12576.
126. Xu, C., Shi, W. y Rosen, B. P. (1996) The chromosomal *arsR* gene of *Escherichia coli* encodes a trans-acting metalloregulatory protein. *J. Biol. Chem.* 5: 2427-2432.
127. Yang, H. C., Cheng, J., Finan, T. M., Rosen, B. P. y Bhattacharjee, H. (2005) Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 187: 6991-6997.
128. Yang, H. C., Fu, H. L., Lin, Y. F. y Rosen, B. P. (2012) Pathways of arsenic uptake and efflux. *Curr. Top. Membr.* 69: 325-358.
129. Yang, H. C. y Rosen, B. P. (2016) New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomed. J.* 39: 5-13.
130. Yang, Y., Wu, S., Lilley, R. y Zhang, R. (2015) The diversity of membrane transporters encoded in bacterial arsenic-resistance operons. *Peer J.* 3:e943: 1-14.
131. Yanisch-Perron, C. y Vieira, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strain: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
132. Ye, J., Nadar, S. V., Lib, V. J. y Rosen, B. P. (2014) Structure of *Escherichia coli* Grx2 in complex with glutathione: a dual-function hybrid of glutaredoxin and glutathione S-transferase. *Acta Crystallogr. D70*: 1907-1913.
133. Ye, J., Yang, H. C., Rosen, B. P. y Bhattacharjee, H. (2007) Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. *FEBS Lett.* 581: 3996-4000.
134. Yoshinaga, M. y Rosen, B. P. (2014) A C-As lyase for degradation of environmental organoarsenical herbicides and animal husbandry growth promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 7701-7706.
135. Zahnle, K., Schaefer, L. y Fegley, B. (2010) Earth's earliest atmospheres. *CSH. Perspect. Biol.* 2: 1-17.
136. Zegers, I., Martins, J. C., Willem, R., Wyns, L. y Messens, J. (2001) Arsenate reductase from *S. aureus* plasmid pI258 is a phosphatase drafted for redox duty. *Nature* 8: 843-847.

137. Zhao, C., Zhang, Y., Chan, A., Chen, S. y Yang, S. (2015) Insights into arsenic multi-operons expression and resistance mechanisms in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. *Front. Microbiol.* 6: 986.
138. Zheng, W., Scifleet, J., Yu, X., Jiang, T. y Zhang, R. (2013) Function of *arsATorf7orf8* of *Bacillus* sp. CDB3in arsenic resistance. *J. Environ. Sci.* 25: 1386-1392.
139. Zhu, YG., Yoshinaga, M., Zhao, F. J. y Rosen, B. P. (2014) Earth abides arsenic biotransformations. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 42: 443-467