



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

TESIS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE GENES
DEL PLÁSMIDO pUM505 QUE PARTICIPAN EN RESISTENCIA A
QUINOLONAS Y EN VIRULENCIA**

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

PRESENTA:

Q.F.B. BIANCA YARELI ROMÁN CÁRDENAS

ASESORA:

D.C. MARTHA ISELA RAMÍREZ DÍAZ

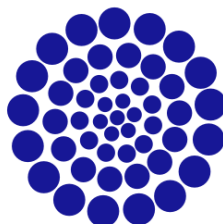
100 años

UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Curso de hombres, crisol de pensadores

MORELIA, MICHOACÁN; 8-7-9A 6F 9 DE 2021.

El presente proyecto de tesis fue realizado en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

DEDICATORIA

A MIS PADRES

La perseverancia que los caracteriza y el valor mostrado para siempre salir adelante, es mi más grande ejemplo.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora

La D.C Martha Isela Ramírez Díaz, agradezco por sus enseñanzas, paciencia y por permitirme formar parte de su equipo de laboratorio. Mi admiración, cariño y respeto, siempre hacia su persona.

A mi comité sinodal:

D.C. Elda G. Beltrán Peña

D.C. Gustavo Santoyo Pizano

D.C. Victor Meza Carmen

D.C. Rafael Ortiz Alvarado

A mis tias y tios

Noradeli, Eliuth, Marilú, Hilda, Vitaelba, Rosendo, Joel y Gustavo gracias por estar siempre presentes.

A mis abuelitos

Mis estrellas, Agustina y Eulalio⁺, que desde el cielo guían cada uno de mis pasos y que en vida me regalaron tanto cariño. Sirenia y Rosendo, es un gran regalo tenerlos conmigo y tener el privilegio de escuchar sus sabios consejos.

A mi equipo de laboratorio

Karen, a quien agradezco enormemente por sus enseñanzas, colaboración y apoyo en todo momento.

Mis increíbles compañeras Brenda, Diana, Andrea y Tere.

A mi novio

Arturo, quien durante diez años ha apoyado cada uno de mis sueños y ha festejado conmigo mis logros. Por su cariño, motivación y paciencia.

A mis amigos

Mi estrellita fugaz, Fer⁺ y a mis brillantes amigos Ise, Mar, Dianita, Andy, Aletz, Sponch, Brau y Trini.

Mi güerita favorita, Oli.

Mi mejor amiga, Lili.

ÍNDICE

Resumen	9
Abstract	10
1. Introducción	11
1.1 Historia de las quinolonas	11
1.2 Relación estructura-actividad de las quinolonas	11
1.3 Clasificación de las quinolonas	14
1.3.1 Primera generación	14
1.3.2 Segunda generación	15
1.3.3 Tercera generación	15
1.3.4 Cuarta generación	15
1.4 Mecanismo de acción de las quinolonas	17
1.5 Resistencia bacteriana a quinolonas	19
1.5.1 Sistemas de resistencia a quinolonas	22
1.5.1.1 Codificados por genes cromosómicos	22
1.5.1.2 Codificados por genes plasmídicos	25
2. Antecedentes	28
2.1 Generalidades de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.2 Plásmido pUM505	29
2.3 Isla de patogenicidad	30
2.3.1 Isla de patogenicidad de pUM505	32
2.4 Participación del plásmido pUM505 en la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	33
2.4.1 Homología del bloque de estructura de mosaico (<i>orfs</i> 22-44) de la PAI de pUM505 que incluye a los <i>orfs</i> 35-37, con la PAI PAPI-1 de <i>P. aeruginosa</i> PA14	33

2.5 Participación del plásmido pUM505 en la resistencia a quinolonas en <i>P. aeruginosa</i> PAO1	35
2.5.1 Identificación de genes de pUM505 que participan en la resistencia a quinolonas.....	35
2.5.2 Resistencia a quinolonas conferida por los <i>orfs</i> 35-37 en <i>E.coli</i> J53-2.....	37
3. Justificación	41
4. Hipótesis	42
5. Objetivos	43
6. Estrategia experimental	44
7. Material y métodos	45
7.1 Medios de cultivo	45
7.2 Cepas utilizadas	45
7.3 Plásmidos y vectores empleados	46
7.4 Oligonucleótidos empleados	49
7.5 Análisis de secuencias	49
7.6 Aislamiento de DNA plasmídico por lisis alcalina	56
7.7 Aislamiento de DNA plasmídico por método de Casse	56
7.8 PCR (Herculasa II)	57
7.9 Extracción de RNA	58
7.10 RT-PCR	58
7.11 PCR	59
7.12 Electroforesis en geles de agarosa	59
7.13 Purificación de DNA por geles de agarosa	60
7.14 Tratamientos enzimáticos.....	60
7.14.1 Ligación de los productos de PCR en pJET 1.2/Blunt.....	60
7.14.2 Ligación de los fragmentos de DNA en pUCP20.....	60
7.14.3 Restricción con endonucleasas.....	60
7.15 Preparación de células competentes en fresco.....	61
7.16 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	61

7.17	Transformación por el método de electroporación	61
7.18	Pruebas de susceptibilidad en medio líquido	62
7.19	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)	62
7.20	Virulencia en el modelo de nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i>	63
8.	Resultados	64
8.1	Análisis del bloque de estructura de mosaico de los <i>orf</i> 35, 36 y 37...64	64
8.2	Búsqueda de probables promotores del operón.....64	64
8.3	Análisis BLAST de las proteínas del operón	66
8.4	Predicción de la estructura secundaria y probable localización de las proteínas codificadas por el operón OPcr.....	66
8.5	Síntesis de un RNA mensajero policistrónico codificado por los <i>orfs</i> del operón OPcr	79
8.6	Amplificación y clonación del operón OPcr	79
8.7	Amplificación y clonación de los <i>orfs</i> individuales del operón OPcr	83
8.8	Curvas de susceptibilidad a quinolonas	83
8.9	Ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC's)	83
8.10	Ensayos de virulencia	89
9.	Discusión	98
10.	Conclusión	107
11.	Bibliografía	108

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa forma parte del grupo de patógenos causantes de la mayor parte de las enfermedades nosocomiales y que además son generadores de multiresistencia a antibióticos, denominado ESKAPE. Éste patógeno oportunista, es capaz de adquirir resistencia e incrementar su virulencia, a través de la transferencia horizontal de genes, mediada por elementos móviles como plásmidos e islas genómicas. El plásmido pUM505, fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa*, posee una isla de patogenicidad que presenta una estructura tipo mosaico, que consiste en bloques de genes relacionados en secuencia y organización a las islas PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14, un aislado clínico altamente virulento. pUM505 fue transferido a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, lo que resultó, por un lado, en un incremento de cuatro veces en la virulencia y por el otro, un aumento en el nivel de resistencia a quinolonas como ciprofloxacina, norfloxacina y moxifloxacina. Para tratar de identificar los genes responsables de esta resistencia, nuestro grupo de trabajo seleccionó a los *orfs* 35, 36 y 37, para determinar su papel en la resistencia a quinolonas, encontrando que estos *orfs* confieren resistencia ciprofloxacina y levofloxacina, probablemente por un sistema de expulsión, cuando son transferidos a la cepa de *Escherichia coli* J53-2, lo cual no ocurre al ser transferidos a la cepa *P. aeruginosa* PAO1, estos resultados sugirieron que es necesaria la participación de genes adicionales para conferir la resistencia. En este trabajo se determinó que los *orfs* 35, 36 y 37 forman parte de un operón de 9 genes que incluye a los *orfs* del 34 al 42, operón que tiene un tamaño de 9,218 pb. Con base a la predicción de estructura secundaria y localización de las proteínas codificadas por los *orfs* del operón, se sugiere que los productos de estos *orfs* podrían estar formando un sistema de resistencia a quinolonas y de virulencia. La transferencia del operón a la cepa de *E. coli* JM101 mostró un nivel elevado de resistencia a un grupo de quinolonas representativas de cada una de las etapas de desarrollo de estos antibióticos, así también, esta transferencia demostró que el operón es capaz de conferir virulencia.

Palabras clave: *P. aeruginosa*, quinolonas, multiresistencia, virulencia, operón.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is part of the group of pathogens that cause most of the nosocomial diseases and that are also generators of multi-resistance to antibiotics, called ESKAPE. This opportunistic pathogen is capable of acquiring resistance and increasing its virulence, through horizontal gene transfer, mediated by mobile elements such as plasmids and genomic islands. The plasmid pUM505 was isolated from a clinical strain of *P. aeruginosa*, it has a pathogenicity island that presents a mosaic-like structure, which consists of blocks of genes related in sequence and organization to the PAPI-1 and PAPI-2 islands of *P. aeruginosa* PA14, a highly virulent clinical isolate. pUM505 was transferred to the *P. aeruginosa* strain PAO1, which resulted, on the one hand, in a four-fold increase in virulence and, on the other, an increase in the level of resistance to quinolones such as ciprofloxacin, norfloxacin and moxifloxacin. To try to identify the genes responsible for this resistance, our working group selected *orfs* 35, 36 and 37, to determine their role in resistance to quinolones, finding that these *orfs* confer resistance to ciprofloxacin and levofloxacin, probably by a system of expulsion, when they are transferred to the *Escherichia coli* J53-2 strain, which does not occur when they are transferred to the *P. aeruginosa* PAO1 strain, these results suggested that the participation of additional genes is necessary to confer resistance. In this work it was determined that *orfs* 35, 36 and 37 are part of a 9-gene operon that includes *orfs* 34 to 42, an operon that is 9,218 bp in size. Based on the prediction of secondary structure and localization of the proteins encoded by the *orfs* of the operon, it is suggested that the products of these *orfs* could be forming a system of resistance to quinolones and virulence. The transfer of the operon to the *E. coli* JM101 strain showed a high level of resistance to a group of quinolones representative of each of the developmental stages of these antibiotics, and this transfer also showed that the operon is capable of conferring virulence. .

Key words: *P. aeruginosa*, quinolones, multi-resistance, virulence, operon.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de las quinolonas

Las quinolonas comprenden a una familia de antibióticos sintéticos utilizados como tratamiento de elección o alternativo para una gran variedad de infecciones, tanto en el ámbito hospitalario como extrahospitalario y además es uno de los grupos de antibióticos de mayor desarrollo. El término "quinolona" se usa de forma genérica para referirse a un grupo de agentes antibacterianos de amplio espectro de acción que incluye a naftiridinas, quinolonas, quinazolininas y isotiazolquinolonas (Drlica y col., 2009).

Cinco décadas trascendieron para que se llevara a cabo el desarrollo de este grupo de antibióticos, sus inicios están marcados por la búsqueda de nuevos fármacos antimaláricos, lo que condujo al descubrimiento de la 7-cloroquinolona y al desarrollo e investigación de compuestos similares, como 1,8-naftiridina, permitiendo la síntesis del ácido nalidíxico en 1962 (Tillotson, 1996). Sin embargo, su uso clínico se reservó para el tratamiento de infecciones del tracto urinario ocasionadas por bacterias gramnegativas con excepción de *Pseudomonas aeruginosa* (Emmerson y Jones, 2003).

Descubrimientos posteriores, fueron de gran importancia, ya que permitieron: mayor comprensión del mecanismo de acción, mejorar la potencia y el espectro de actividad antibacteriana gracias a modificaciones en el núcleo naftiridina, que es la estructura base del ácido nalidíxico, la oportunidad de mejorar la farmacocinética y farmacodinamia, así también, una comprensión clara de la relación estructura-actividad (Andriole, 2005).

1.2 Relación estructura-actividad de las quinolonas

Las quinolonas han sido el centro de un considerable interés, tanto científico como clínico, debido a que ofrecen muchos de los atributos de un antibiótico ideal: alta potencia, amplio espectro de acción, buena biodisponibilidad, formulaciones orales e intravenosas, altos niveles en suero, un amplio volumen de distribución y baja

incidencia de efectos adversos (Bolon, 2011); sin embargo, para lograr estas características se han realizado una gran cantidad de modificaciones tomando como referencia su estructura base (**Figura 1**).

Las quinolonas químicamente son estructuras bicíclicas heteroaromáticas, su estructura base incluye a un núcleo piridona- β -ácido carboxílico y a un anillo aromático. La relación entre la estructura química y la actividad biológica (relación estructura-actividad) de estas moléculas, ha motivado a la síntesis de compuestos que posean diferentes radicales en la estructura química básica (Mella y col., 2000).

En la posición 1, el sustituyente de mayor importancia es el grupo ciclopropil, que combina favorables propiedades estéricas, espaciales y de interacción electrónica, de esta manera, la quinolona de mayor uso clínico, ciprofloxacina, exhibe una potente actividad sobre *P. aeruginosa* y enterobacterias, sin embargo, la adición de un grupo 2,4-difluorofenil también incrementa la potencia, especialmente contra anaerobios. En la posición 2, son pocas las modificaciones que se han realizado puesto que se encuentra cerca de la unión al sitio blanco, de manera que el sustituyente más frecuentemente encontrado es un hidrógeno (H) (Mella y col., 2000).

Las posiciones 3 y 4 son analizadas en conjunto dada su importancia, el ácido carboxílico en el C3 y un grupo ceto en el C4 son fundamentales para la actividad de estos compuestos, ya que permiten la unión a su sitio objetivo, que son las topoisomerasas bacterianas, hasta la fecha no se han reportado sustituciones que puedan incrementar la actividad (Anderson y MacGowan, 2003). En la posición 5, se han introducido sustituyentes pequeños como grupos amino, hidroxilo o metilo, los cuales incrementan absorción, distribución y actividad *in vitro* sobre bacterias Gram positivas (Yoshida y col., 1996).

El gran descubrimiento correspondió a la síntesis de compuestos que presentaban los sustituyentes 6- fluoro, 7- piperazinil (norfloxacina, ciprofloxacina), los cuales dieron origen al grupo que se ha denominado fluoroquinolonas. Una de las

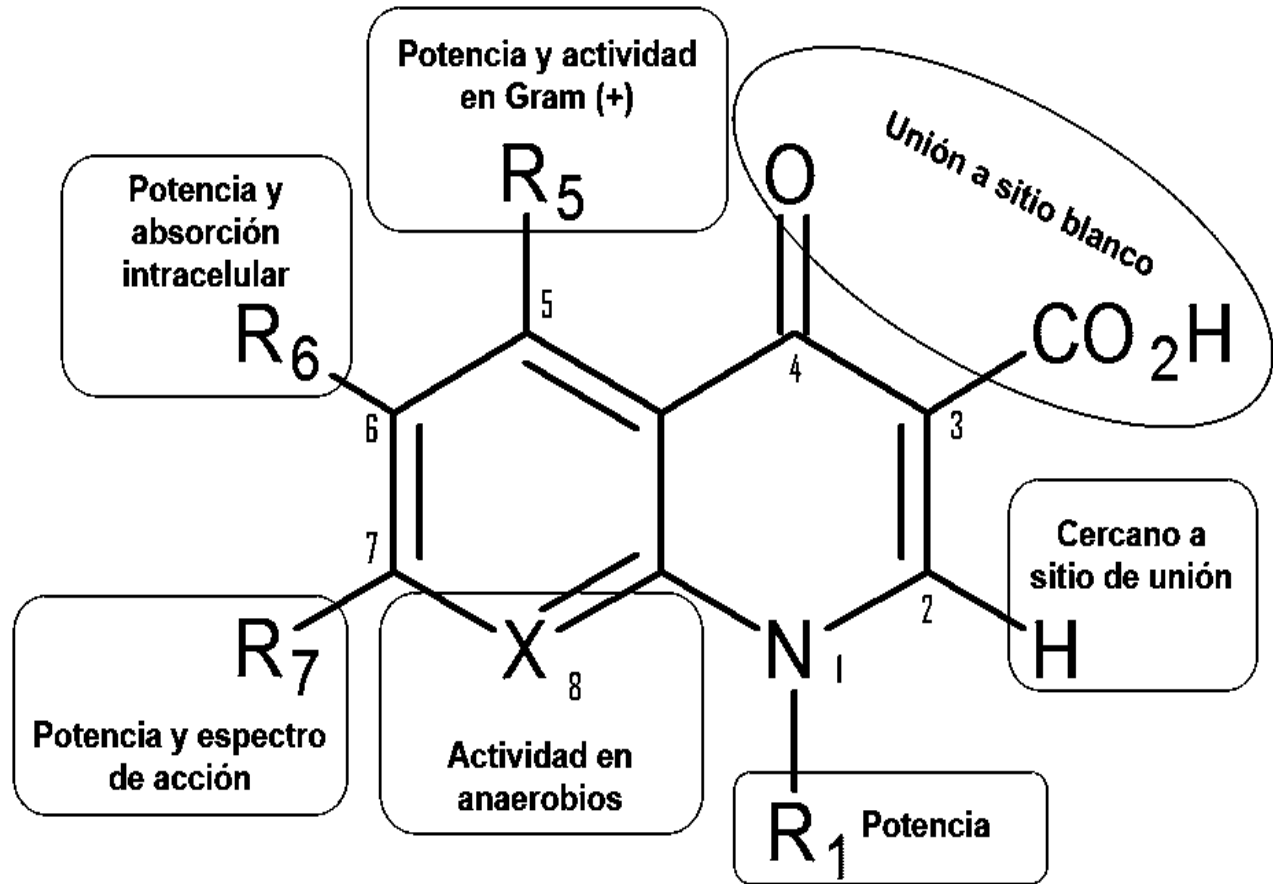


Figura 1. Estructura base de las quinolonas y funciones de cada sustituyente. Se marcan con grupos R las posiciones más comúnmente sustituidas. Se indican los principales procesos en los que participan las modificaciones de cada posición (modificado de Andersson y MacGrowan, 2003).

primeras modificaciones fue en la posición 6, la presencia de un átomo de flúor incrementó más de 10 veces su potencia y se considera que estabiliza la unión con su sitio blanco al influenciar la distribución de cargas (Laponogov y col., 2008). La posición 7 es una de las más investigadas, representa uno de los hitos dentro del desarrollo de antimicrobianos de esta familia, en esta posición, los anillos heterocíclicos de cinco o seis miembros tienen una buena actividad biológica; por tanto, los grupos químicos que con más frecuencia se utilizan en esta posición son piperazina y pirrolidina, la presencia de un grupo metilo en el C4 del grupo piperazina incrementa la actividad sobre especies Gram positivas. También destacan los sustituyentes azabicyclo que confieren una potente actividad sobre cocos Gram positivos, patógenos atípicos y anaerobios. En la posición 8, la presencia de halógenos, en particular Cl y F, aumenta la actividad contra anaerobios y mejora la absorción por vía oral, la adición de nitrógeno, grupos metilo o metoxi, incrementan su actividad antibacteriana (Mella y col., 2000).

Debe destacarse, que a pesar de que ciertos sustituyentes, como los mencionados anteriormente, pueden producir importantes cambios en la actividad biológica de la quinolona, sus características finales derivan de la interacción entre cada uno de los radicales y el núcleo de estos antimicrobianos (Mella y col., 2000).

1.3 Clasificación de las quinolonas

La forma más común de clasificar a las quinolonas, es dentro de cuatro generaciones en función de su desarrollo y actividad antibacteriana (**Figura 2**).

1.3.1 Primera generación

Está conformada por las primeras moléculas sintetizadas: ácido nalidíxico y el ácido oxolínico. Son activas frente a microorganismos gramnegativos como las enterobacterias, sin embargo, la excepción ocurre con *P. aeruginosa*, presenta una actividad nula contra organismos Gram positivos y anaerobios. Una característica que destaca de esta generación es el rápido desarrollo de microorganismos resistentes. (Emmerson y Jones, 2003).

1.3.2 Segunda generación

Ha estado disponible desde mediados de 1980 y fue responsable de un grande cambio en el tratamiento clínico. Presenta un espectro de actividad extendido contra organismos Gram negativos, respecto a la primera generación; adicionalmente, infecciones respiratorias causadas por *P. aeruginosa* en niños con fibrosis quística pudieron ser tratadas oralmente. Una desventaja de este grupo de quinolonas es su actividad limitada contra bacterias Gram positivas (Ball, 2000). En esta generación se encuentran, norfloxacin y ciprofloxacina, siendo esta última la fluoroquinolona más potente contra bacterias Gram negativas y el tratamiento de elección para la infecciones ocasionadas por *P. aeruginosa* (Emmerson y Jones, 2003).

1.3.3 Tercera generación

Las quinolonas de esta generación se caracterizan por la presencia de heterociclos de nitrógeno en la posición 7, poseen un espectro extendido contra cocos Gram positivos como *Streptococcus pneumoniae* y alta efectividad en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias anaerobias y patógenos atípicos, conservan la actividad contra bacterias Gram negativas. Dentro de esta generación se encuentra levofloxacina (Álvarez y col., 2015).

1.3.4 Cuarta generación

Esta generación presentó múltiples cambios debido a la búsqueda de la mejor combinación entre seguridad y eficacia. Dichos cambios incluyeron la adición de ciclopropil en la posición C1 y un grupo metoxi en C8, además, se substituyó el átomo de flúor en C6 y piperazina o pirrolidina en C7, por lo que se les nombró des-fluoroquinolonas (Álvarez y col., 2015). Moléculas como gemifloxacina y moxifloxacina forman parte de esta generación, siendo esta última uno de los antibióticos más utilizados en el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio como la neumonía. Poseen un espectro extendido contra bacterias

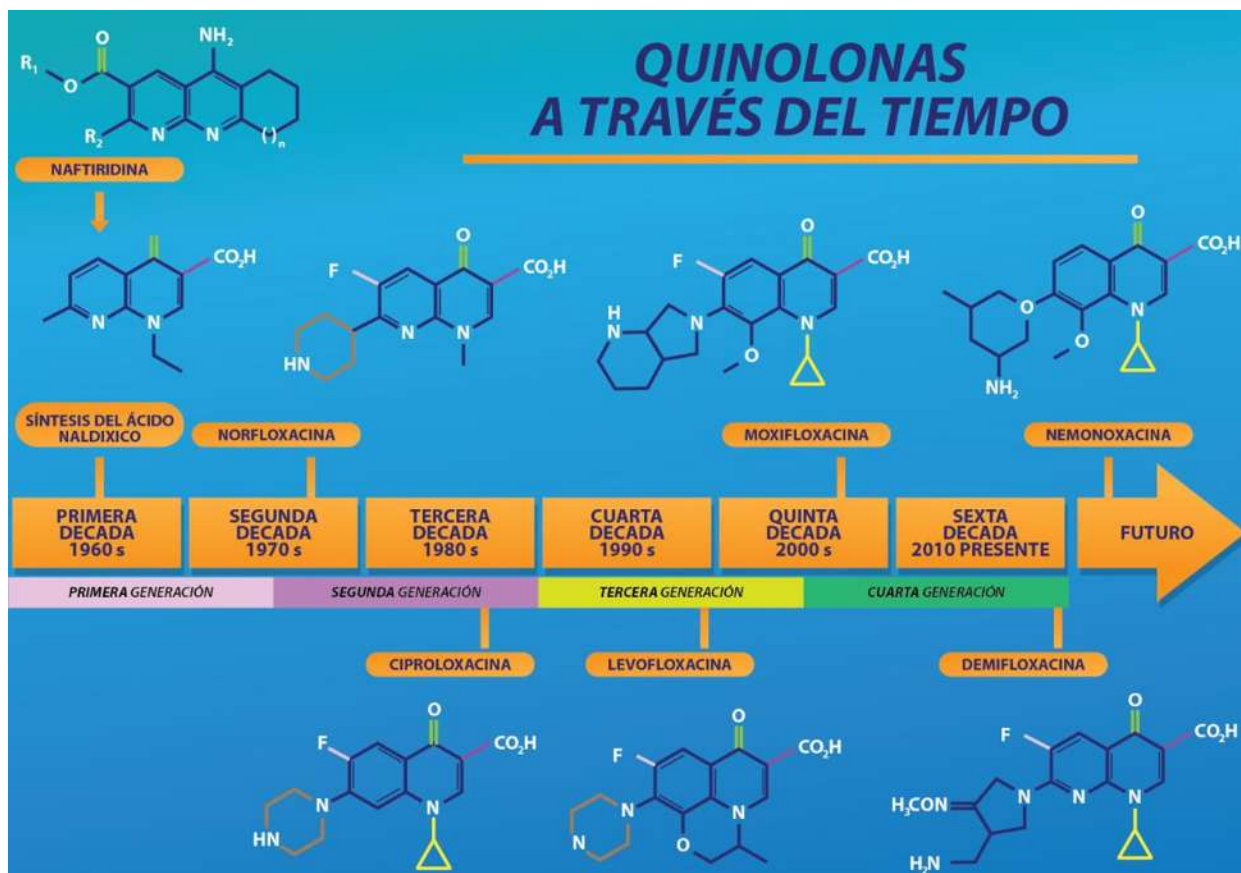


Figura 2. Quinolonas a través del tiempo. Se muestran las etapas de desarrollo de las quinolonas, las cuatro generaciones de quinolonas a través de casi seis décadas, desde la síntesis del ácido nalidíxico (1962) hasta el desarrollo de la nemonoxacina (2014). Se presentan las estructuras químicas de quinolonas representativas de las distintas generaciones y en diferentes colores los grupos funcionales característicos de cada quinolona (modificada de Emmerson y col., 2003).

anaerobias y atípicas, así como frente a cocos Gram positivos (Beisswenger y col., 2014).

1.4 Mecanismo de acción de las quinolonas

El mecanismo de acción de las quinolonas consiste en inhibir dos enzimas claves para la replicación, transcripción y reparación del DNA de la célula bacteriana: la DNA topoisomerasa II o también llamada DNA girasa y la topoisomerasa IV, las cuales pertenecen a la familia de topoisomerasas IIA y el núcleo de su función enzimática radica en reacciones de escisión y ligadura, que modulan el estado topológico del DNA (Aldred y col., 2014). Ambas enzimas se componen de dos subunidades y funcionan como heterotetrámeros, las subunidades de la DNA girasa son GyrA y GyrB, en el caso de la Topoisomerasa IV son ParC y ParE en especies Gram negativas y GrlA y GrlB en especies Gram positivas (Aldred y col., 2014).

Estas enzimas presentan similitudes estructurales y mecánicas, sin embargo, funcionan de forma diferente. La girasa II introduce superenrollamientos negativos en el ADN, es principalmente responsable de eliminar el estrés torsional que se acumula frente a las horquillas de replicación y los complejos de transcripción. (Aldred y col., 2014). Por otro lado, la topoisomerasa IV introduce superenrollamientos positivos avanzando detrás de la horquilla de replicación, también puede introducir superenrollamientos negativos y su función principal es eliminar los nudos que se acumulan en el cromosoma bacteriano como resultado de los procesos celulares fundamentales y es responsable de la segregación de los cromosomas (Redgrave y col., 2014) (**Figura 3**).

Para ejercer su mecanismo de acción, las quinolonas son transportadas al interior de la célula bacteriana mediante difusión simple (Jacoby, 2005). Una vez dentro, generan un par de cortes en la cadena sencilla de DNA y se unen covalentemente al extremo 5' recién generado formando un complejo de escisión DNA-topoisomerasa, lo cual relaja el superenrollamiento del DNA (Drlica y col., 2009)

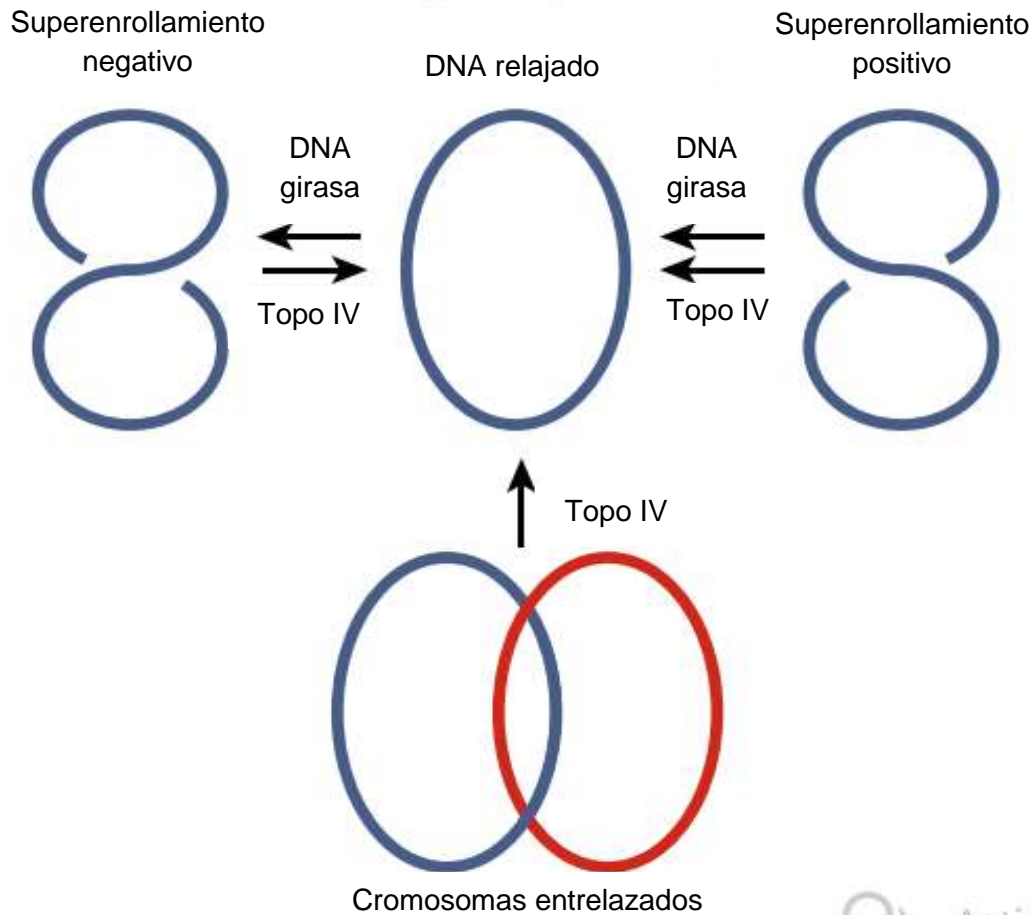


Figura 3. Acción de las topoisomerasas tipo II sobre el ADN. El control del superenrollamiento por topoisomerasas tipo II en bacterias. El superenrollamiento es una medida de cuán sobre o sub-enrollada está la doble hélice y es necesaria para el empaquetamiento del cromosoma bacteriano dentro de la célula y para aliviar el estrés torsional resultante de la replicación del ADN (modificado de Redgrave y col., 2014).

(Figura 4). Las quinolonas se unen de forma rápida a este complejo a través de una interacción iónica, en la que participa un ion Mg^{2+} no catalítico que es quelado por los grupos ceto y carboxilo de los C3 y C4 de la quinolona, el ion metálico es coordinado por cuatro moléculas de agua, dos de ellas situadas lo suficientemente cerca para formar enlaces de hidrógeno con las cadenas laterales de los residuos ácidos y de serina de la topoisomerasa (Wohlkonig y col., 2010) (Figura 5).

La formación de este complejo ternario DNA-topoisomerasa-quinolona bloquea el movimiento de la horquilla de replicación y de los complejos transcripcionales, inhibiendo el crecimiento bacteriano, este proceso, es reversible si se remueve la quinolona, ya sea por acción del agente quelante EDTA o por tratamiento térmico sin embargo, al no revertirse, se induce la respuesta del sistema SOS para mejorar la capacidad de reparación del DNA, lo que lleva a la formación de células filamentosas debido a la inhibición de la división celular lo que en conjunto ocasiona una muerte celular (Drlica y col., 2009). Las dos vías de acción de las quinolonas que ocasionan una muerte celular rápida son: i) la vía dependiente de la síntesis de proteínas o la vía sensible al cloranfenicol y en condiciones de anaerobiosis, que es característica de la primera generación de quinolonas y ii) la vía independiente de la síntesis de proteínas y en condiciones aeróbicas; ambas vías dan lugar a la fragmentación del ADN cromosómico, que surge debido a la remoción del complejo ternario, lo cual puede ocurrir por la digestión de las topoisomerasas mediada por proteasas o nucleasas. Una vez que comienza la fragmentación del cromosoma se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que son las responsables de la muerte celular (Drlica y col., 2008).

1.5 Resistencia bacteriana a quinolonas

El descubrimiento de los antibióticos fue un punto de inflexión en la historia de la humanidad, puesto que han revolucionado a la medicina en muchos aspectos y se han salvado un número de vidas incalculable. No obstante, el uso exitoso de

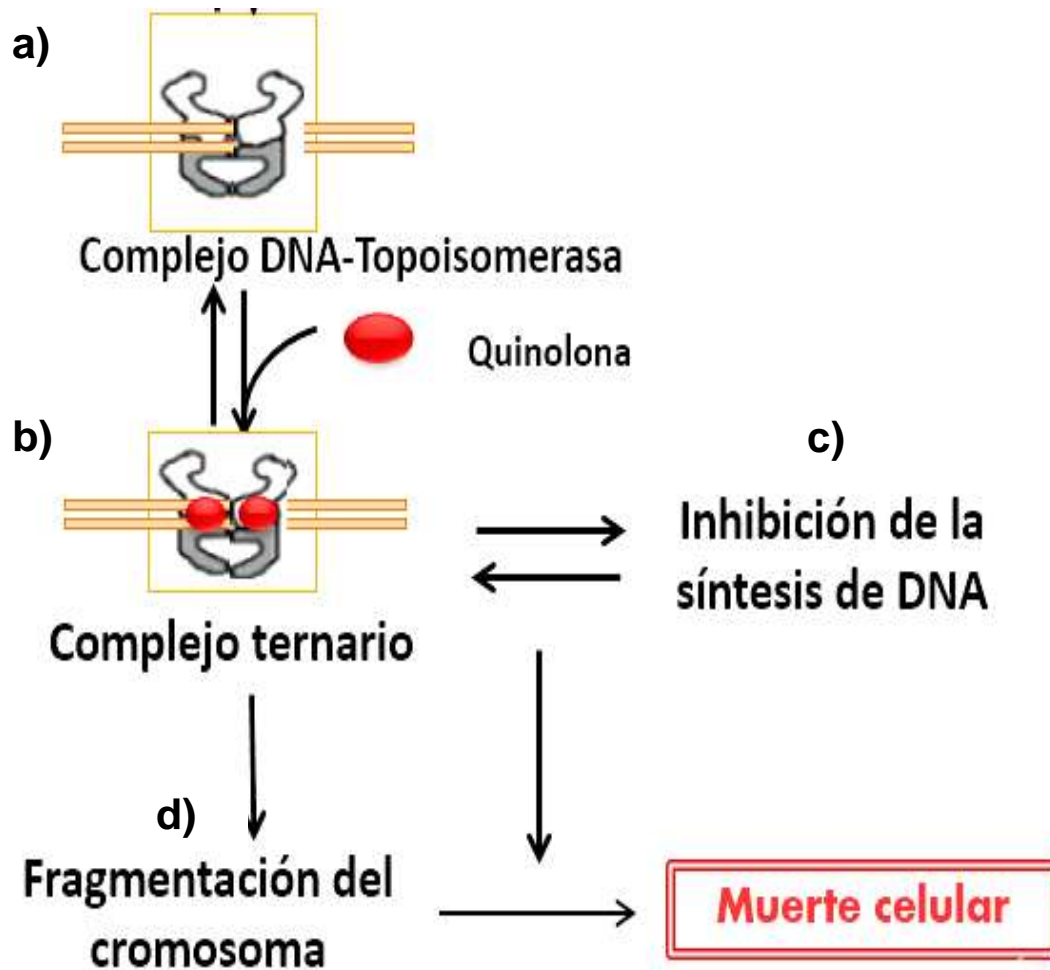


Figura 4. Representación esquemática de la acción de las quinolonas. (a) Unión de la topoisomerasa con el DNA y formación del complejo DNA-Topoisomerasa; (b) unión de la quinolona y formación del complejo ternario DNA-Topoisomerasa-Quinolona; (c) inhibición de la replicación que conduce a la inducción del sistema SOS y a la filamentación celular; (d) fragmentación letal del cromosoma (modificado de Drlica y col. 2009).

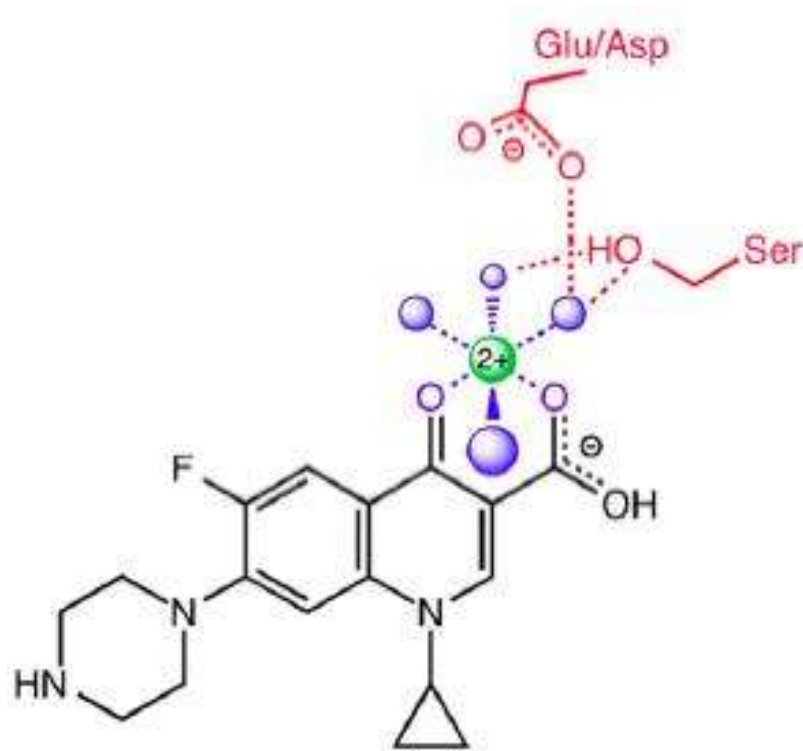


Figura 5. La unión de quinolona-topoisomerasa se facilita mediante una interacción iónica agua-metal. La ciprofloxacina (quinolona de segunda generación) está coloreada de color negro y el ion Mg^{2+} no catalítico es de color verde. Las líneas discontinuas azules indican la esfera de coordinación octaédrica del ión metálico divalente que interactúa con cuatro moléculas de agua y el cetoácido C3 / C4 de la quinolona. Las líneas de trazos rojos representan enlaces de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la serina o el grupo carboxilo de la cadena lateral del residuo ácido. Para mayor claridad, se ha omitido el ADN de la imagen (modificado de Aldred y col., 2014).

cualquier antibiótico desde que usa por primera vez, se ve comprometido por el potencial desarrollo de tolerancia o resistencia por parte del microorganismo contra el que es empleado (Davis y Davis, 2010). A causa del origen sintético de las quinolonas, durante mucho tiempo se consideró, que los únicos mecanismos de resistencia a quinolonas podrían ser a través de mutaciones en genes que codifican a las topoisomerasas tipo IIA o a los transportadores de membrana (Martínez, 2009). Del mismo modo, no se conceptuó la idea, de que se pudiera adquirir resistencia mediante la transferencia horizontal de genes, ya que los genes de resistencia a antibióticos de origen biológico, son producidos por los propios organismos (Hernández y col., 2011).

1.5.1 Sistemas de resistencia a quinolonas

Los sistemas de resistencia a quinolonas son divididos en dos grupos: los que son codificados por genes cromosómicos y los que son codificados por genes plasmídicos (**Figura 6**).

1.5.1.1 Codificados por genes cromosómicos

i) Modificación de las moléculas blanco

Tras la introducción del ácido nalidíxico, la primera quinolona que se utiliza clínicamente, pronto se observó resistencia bacteriana producida por mutaciones en uno o más de los genes que codifican a los objetivos primarios y secundarios de estos fármacos, las topoisomerasas tipo II. La región donde surgen estas mutaciones, que dan lugar a sustituciones de aminoácidos y que alteran la estructura de la proteína diana así como su afinidad de unión, es conocida como “región determinante de la resistencia a las quinolonas” (QRDR, por sus siglas en inglés) y se encuentra muy cercana al sitio activo donde la enzima se une al DNA (Redgrave y col., 2014).

En bacterias Gram negativas como *E. coli* y *P. aeruginosa*, la ADN girasa es el objetivo primario de las quinolonas, aunque la topoisomerasa IV también se

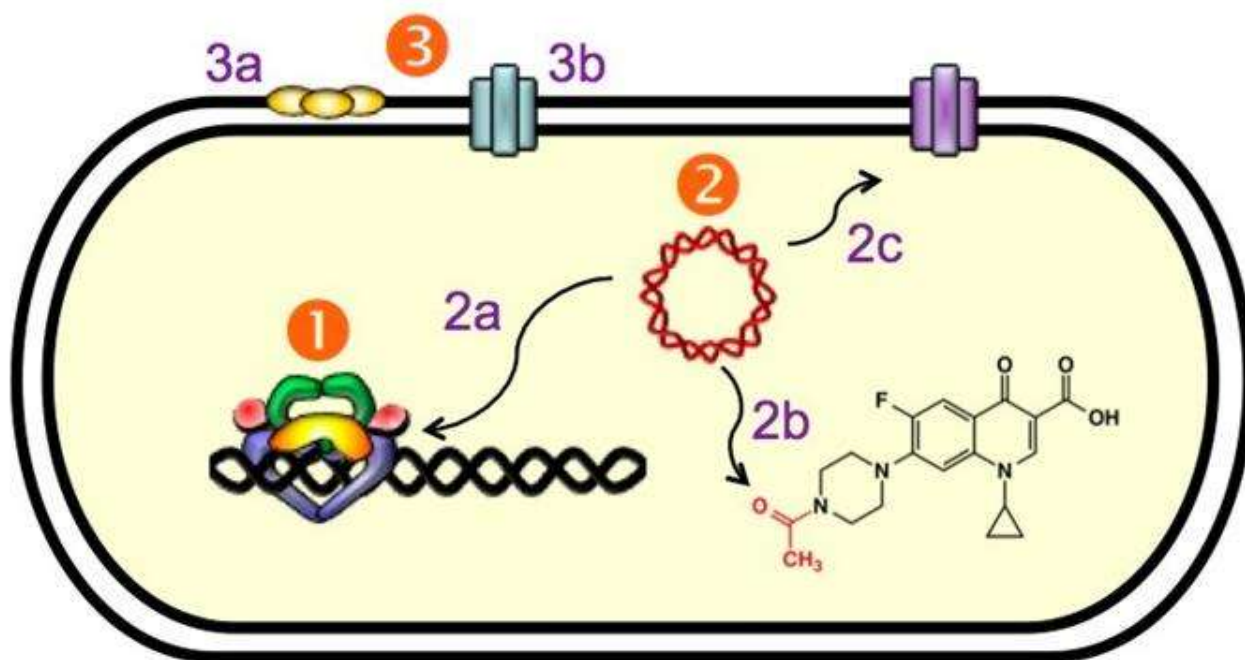


Figura 6. Resistencia bacteriana a quinolonas. Se representa una célula bacteriana mostrando los sistemas de resistencia a las quinolonas. Los detalles de cada sistema se describen en el texto. (1) Resistencia mediada por mutaciones en los genes que codifican a las proteínas blanco (DNA girasa y topoisomerasa IV), (2) Resistencia mediada por genes plasmídicos, (2a) Proteínas Qnr (en amarillo) que disminuyen la unión del complejo DNA-topoisomerasa, (2b) Aac (6')-Ib-cr es una enzima que acetila algunas quinolonas, disminuyendo su efectividad. (2c) Sistemas de expulsión que disminuyen la concentración intracelular de las quinolonas. (3) Resistencia mediada por genes cromosómicos, (3a) Disminución de la expresión de porinas, (3b) Sistema de expulsión (tomada de Aldred y col., 2014).

convierte en un objetivo una vez que se muta al gen *gyrA*, estas mutaciones primarias a menudo implican una sustitución en la serina 83 o en el ácido aspártico 87 (en *E. coli*) dentro de GyrA (Yoshida y col., 1990). En el caso de bacterias Gram positivas, los genes que codifican a la topoisomerasa IV son el objetivo primario, las mutaciones se encuentran principalmente en el gen *parC*, pero las bacterias que son altamente resistentes poseen mutaciones adicionales en los genes *gyrA* y *parE* (Ferrero y col., 1994).

ii) Regulación de la expresión de porinas

Las quinolonas atraviesan la membrana citoplasmática por difusión simple mediante porinas localizadas en la membrana externa, que sirven como canales de difusión y permiten el paso de moléculas hidrofílicas pequeñas, como las quinolonas (Weinstein y Hooper, 2005). Las bacterias Gram negativas pueden regular la permeabilidad de la membrana alterando la expresión de las porinas de la membrana externa que forman canales, como las proteínas OmpF y OmpC en *E. coli*, limitando de esta manera el ingreso de las quinolonas (Choi y Lee, 2019). La resistencia a quinolonas se ve poco afectada al reducir la expresión de los genes que codifican las porinas únicamente, en cambio esta resistencia se vuelve significativa cuando se combina con mecanismos de resistencia adicionales (Hooper, 2005).

iii) Sistemas de expulsión

Los sistemas de expulsión o también conocidos como bombas de eflujo bacterianos, son inespecíficos, pueden expulsar a múltiples fármacos o compuestos tóxicos, lo que reduce su concentración intracelular, generando así, la resistencia bacteriana. Estos sistemas, son clasificados en las siguientes cinco familias: sistemas que unen ATP (ABC), superfamilia de facilitadores principales (MFS), sistemas de resistencia, nodulación y división celular (RND), proteínas pequeñas de resistencia a multidroga y sistemas de expulsión de múltiples fármacos y compuestos tóxicos (MATE). Los sistemas ABC son relevantes en anaerobios y bacterias Gram positivas, en el caso de las bacterias Gram

negativas, las bombas de flujo que predominan y las mejor estudiadas pertenecen a las familias MFS y RND, estos sistemas consisten en proteínas citoplasmáticas, periplásmicas y de membrana externa que se asocian para formar sistemas de expulsión tripartitas de múltiples componentes (Martínez, 2009).

En *P. aeruginosa*, se han descrito sistemas de expulsión codificados por genes cromosómicos, entre los que destacan: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexCD-OprN y MexXY, debido a su contribución en la resistencia a antimicrobianos de aislados clínicos. Estos sistemas de expulsión tripartita, confieren resistencia a quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos y a los antibióticos β -lactámicos (Aquino y col., 2009). El sistema MexAB-OprM es la única bomba de flujo expresada constitutivamente en *P. aeruginosa*, pertenece a la familia RND y confiere resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacina, además es capaz de expulsar bromuro de etidio, un compuesto aromático fluorescente que se intercala con el DNA (Xu y col., 2012). MexAB-OprM está constituido por una proteína que penetra la membrana interna y desempeña un papel importante en la salida del fármaco a través de un gradiente de protones, MexB, una proteína de membrana externa que asegura la ruta de salida del compuesto, OprM, y de una proteína de fusión de membrana, MexA, que conecta a MexB con OprM (Tsutsumi y col., 2019).

1.5.1.2 Codificados por genes plasmídicos

i) Proteínas Qnr

En 1998, se descubrió el primer mecanismo de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR): las proteínas Qnr, las cuales se encontraron por primera vez en el plásmido pMG252 de un aislado de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente que podía transferir un nivel bajo de resistencia al ácido nalidíxico, ciprofloxacina y otras quinolonas. El gen responsable que las codifica se denominó *qnr* porque confiere resistencia a quinolona, el nombre de este gen ha sido modificado a *qnrA*, puesto que se han descrito alelos *qnr* adicionales. Hasta la

fecha, se han descrito cerca de 100 genes que se agrupan en 5 familias distintas: *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* y *qnrS* (Salah y col., 2019).

Las proteínas Qnr pertenecen a la familia de pentapéptidos repetidos, definida de esta manera por los cinco aminoácidos repetidos en tándem con un motivo recurrente [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser, Thr, Arg] [Gly] (Vetting y col., 2006). Estas proteínas protegen al DNA de la acción de las quinolonas, al unirse a ambas subunidades de la DNA girasa y de la topoisomerasa IV en las primeras etapas de interacción con el DNA, logrando así reducir la cantidad de dianas de holoenzima-DNA (Nordmann y Poirel, 2005). La protección se produce a concentraciones bajas de Qnr en relación con la quinolona (Jacoby y col., 2014).

ii) Modificación enzimática por una aminoglucósido acetiltransferasa

La investigación de un plásmido PHS10-2 que posee el gen *qnrA*, proporcionó más del nivel esperado de resistencia a ciprofloxacina, lo que condujo al descubrimiento en 2006 de un segundo mecanismo para PMQR: la modificación de ciertas quinolonas por una aminoglucósido acetiltransferasa particular, *aac(6')-Ib-cr* (Jacoby y col., 2014).

El análisis de secuencia del gen *aac(6')-Ib* mostró que se encuentra modificado en los codones 102 (Trp -> Arg) y 179 (Asp -> Tyr), y al llevar a cabo una mutagénesis dirigida a estos codones, se demostró que la ausencia de estas mutaciones trae como consecuencia que el gen no se asocie con la resistencia a quinolonas. Su mecanismo de acción consiste en introducir un grupo acetilo en el nitrógeno no sustituido del anillo de piperazina que poseen ciprofloxacina y norfloxacina en la posición 6 (Robicsek y col., 2006).

iii) Modificación enzimática por CrpP

Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se identificó el gen *crpP*, el cual es capaz de conferir resistencia a ciprofloxacina, a través de un mecanismo

enzimático de fosforilación dependiente de ATP, que favorece a la degradación del antibiótico. El gen *crpP* es codificado por el plásmido pUM505, aislado de un caso clínico de *P. aeruginosa* (Chávez y col., 2018).

El producto de 65 aminoácidos codificado por *crpP* (*orf* 131) muestra un 18% de identidad de aminoácidos con una aminoglucósido acetiltransferasa de *Mycobacterium smegmatis*, esta enzima fosforila e inactiva los antibióticos aminoglucósidos. El gen *crpP* se encuentra ampliamente distribuido en aislados de origen clínico, y las proteínas homologas CrpP posee los aminoácidos conservados como la Gly7, Asp9, Lys33 y Cys40. Al realizarse ensayos de mutación mediante fusión por PCR, se logró identificar que estos aminoácidos conservados en proteínas CrpP, desempeñan un papel esencial para el mecanismo enzimático. Además, se determinó que mutaciones en los codones que codifican a estos aminoácidos, no ejercen actividad catalítica, por lo que no son capaces de modificar la molécula de ciprofloxacina (Chávez y col., 2020).

iv) Sistemas de expulsión

En Japón, se identificó el gen *qepA*, presente en el plásmido pHPA de una cepa clínica *E. coli* C316, aislada en 2002 de la orina de un paciente hospitalizado. Este gen codifica a la proteína de membrana interna QepA, que posee 14 segmentos transmembranales y pertenece a la familia MFS. La proteína confiere resistencia a quinolonas como ácido nalidíxico, ciprofloxacina y norfloxacina (Yamane y col., 2008).

En 2004, se identificó el plásmido pOLA52 de una cepa de *E. coli* aislada de estiércol porcino en Dinamarca, lo que representó un nuevo sistema de expulsión a múltiples fármacos, puesto que, el plásmido contiene a los genes *oqxA* y *oqxB*, los cuales codifican a OqxA, una proteína de membrana interna que pertenece a la familia RND, y a OqxB, una proteína de periplasma (Hansel y col., 2004). Las proteínas OqxAB confieren resistencia a las quinolonas ciprofloxacina y ácido nalidíxico, también a detergentes y desinfectantes, tales como, cloruro de benzalconio y SDS (Li y col., 2019).

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de *P. aeruginosa*

A finales del siglo XIX, el género bacteriano *Pseudomonas* fue descrito por el profesor Walter Migula del Instituto Karlsruhe, en Alemania como “*Células con órganos polares. La formación de esporas ocurre en algunas especies, pero es raro*”. Actualmente, se sabe que las cepas de *Pseudomonas* no producen esporas y que probablemente lo que observó son gránulos refráctiles de materiales de reserva, el término *Pseudomonas* hace referencia etimológicamente a unas “falsas unidades o monadas” (Palleroni, 2010). En 1872, el investigador Schroeder acuña el término “*aeruginosa*” al observar en ciertas condiciones de cultivo un color verde-azulado similar al cobre oxidado a causa de la producción de piocianina, un pigmento soluble en agua (Hugh y col., 1964).

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa, con forma de bastón, móvil por la presencia de un flajelo polar, pertenece a la rama de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias (Pace y col., 1997). Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, es ubiqüa en suelo y agua; pero también puede sobrevivir en ambientes inhóspitos como son el combustible para aviones, solución de clorhexidina y jabón, gracias a que necesita requerimientos nutricionales mínimos y es capaz de tolerar diversos medios físicos, por ejemplo, temperaturas elevadas y concentraciones bajas de oxígeno (Hardalo y Edberg, 1997).

Esta bacteria es un patógeno oportunista de humanos, plantas y animales. En humanos, es uno de los principales organismos causantes de enfermedades nosocomiales, infecta gravemente a pacientes inmunocomprometidos e intubados-ventilados; pero principalmente a las víctimas de quemaduras y fibrosis quística (Lupo y col., 2018). Es causante de neumonías, infecciones del tracto urinario y bacteriemias (Ochoa y col., 2013).

La patogenicidad de *P. aeruginosa* se atribuye a la expresión de un arsenal de factores de virulencia, o también llamados determinantes de patogenicidad, los cuales actúan a diferentes niveles durante la infección. Posee factores relacionados a movilidad y adherencia como un flagelo polar y pilis tipo IV, también es capaz de producir una cápsula extracelular de alginato, como mecanismo de evasión para los anticuerpos y la fagocitosis de las células inmunológicas. Tiene sistemas de secreción especializados a través de los cuales secreta toxinas como: ExoA, ExoT, ExoS, ExoU, y ExoY, las que pueden llegar a inducir apoptosis. Elastinas como: LasA y LasB, encargadas de la degradación de fibras elásticas como elastina, colágeno y fibrina lo que facilita la difusión de la infección destruyendo las barreras físicas e inhibiendo la quimiotaxis de los monocitos. Asimismo, esta bacteria secreta piocianina, un pigmento azul-verdoso que genera efectos pro-inflamatorios y estrés oxidativo, lo que conduce a la necrosis del tejido respiratorio y además inhibe el desarrollo de organismos competidores (Ben y col., 2011). Otro de los factores de virulencia altamente estudiados, es el sistema Quorum sensing, un mecanismo basado en la comunicación intercelular que permite la adaptación de una población bacteriana a los cambios microambientales, mediante la acción de pequeñas moléculas llamadas autoinductores o acil-homoserina lactonas (AHL) que difunden a través de las membranas bacteriana (Paz y col., 2019).

P. aeruginosa PAO1 es la cepa de referencia más común utilizada en investigación para análisis genéticos y funcionales de la fisiología y metabolismo de *Pseudomonas*, fue aislada de un paciente con otitis media. En el año 2000, se concluyó la secuenciación de su genoma, la cual se encuentra disponible en internet (www.pseudomonas.com), el análisis reportó que el genoma de esta bacteria incluye a un único cromosoma circular de 6.3 millones de pares de bases y predice 5,570 marcos de lectura abiertos (Stover y col., 2000)

2.2 Plásmido pUM505

El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de un paciente hospitalizado en la ciudad de Morelia, Michoacán. En el año 2011, nuestro equipo de trabajo

realizó la secuenciación y análisis de la secuencia del plásmido, se encontró, que su secuencia de nucleótidos completa se ensambla en una secuencia circular de ADN de 123,322 pares de bases con un contenido de G + C de 60,5%. Los marcos de lectura abiertos (orf, por sus siglas en inglés) predichos son 138, la mayoría de ellos codificados en la hebra de ADN complementario (75%), con respecto al origen de replicación predicho (oriV) (Ramírez-Díaz y col, 2011).

pUM505 presenta una organización genética particular en la que destacan dos islas genómicas que corresponden a 98 kb de plásmido total. La primera es una isla pequeña (31 kb) que posee genes implicados en la movilidad y resistencia a metales pesados, como cromo y mercurio. La segunda, una región grande (67 kb), correspondiente a una isla de patogenicidad que contiene genes implicados en virulencia, replicación, mantenimiento y transferencia conjugativa del plásmido (**Figura 7**) (Ramírez-Díaz y col., 2011).

2.3 Isla de patogenicidad

Una isla de patogenicidad (PAI) es una región genómica particular de un patógeno que tiene uno o más genes asociados a virulencia, los cuales han sido adquiridos en bloque del ADN de otros organismos, especies o incluso géneros (Hacker y Kaper, 1999). El concepto de PAI fue acuñado a finales de la década de 1980 por Jörg Hacker y colaboradores del grupo de Werner Goebel en la Universidad de Würzburg, Alemania, quienes estaban investigando la base genética de la virulencia de enterobacterias patógenas, especialmente *E. coli*. Además, este mismo grupo de trabajo demostró que la delección de un PAI conducía a un fenotipo no patógeno de la cepa 536 de *E. coli*, lo que sugirió que tales delecciones son un mecanismo genético para modular la virulencia bacteriana (Knapp y col., 1986; Hacker y col., 2000). Las PAI se adquieren e intercambian por transferencia horizontal de genes y pueden encontrarse en especies muy divergentes, lo que dificulta la búsqueda de sus orígenes (He et al., 2004).

Las PAI presentan características particulares, entre las que se destacan las siguientes: i) poseen uno o más genes de virulencia, ii) están presentes en los

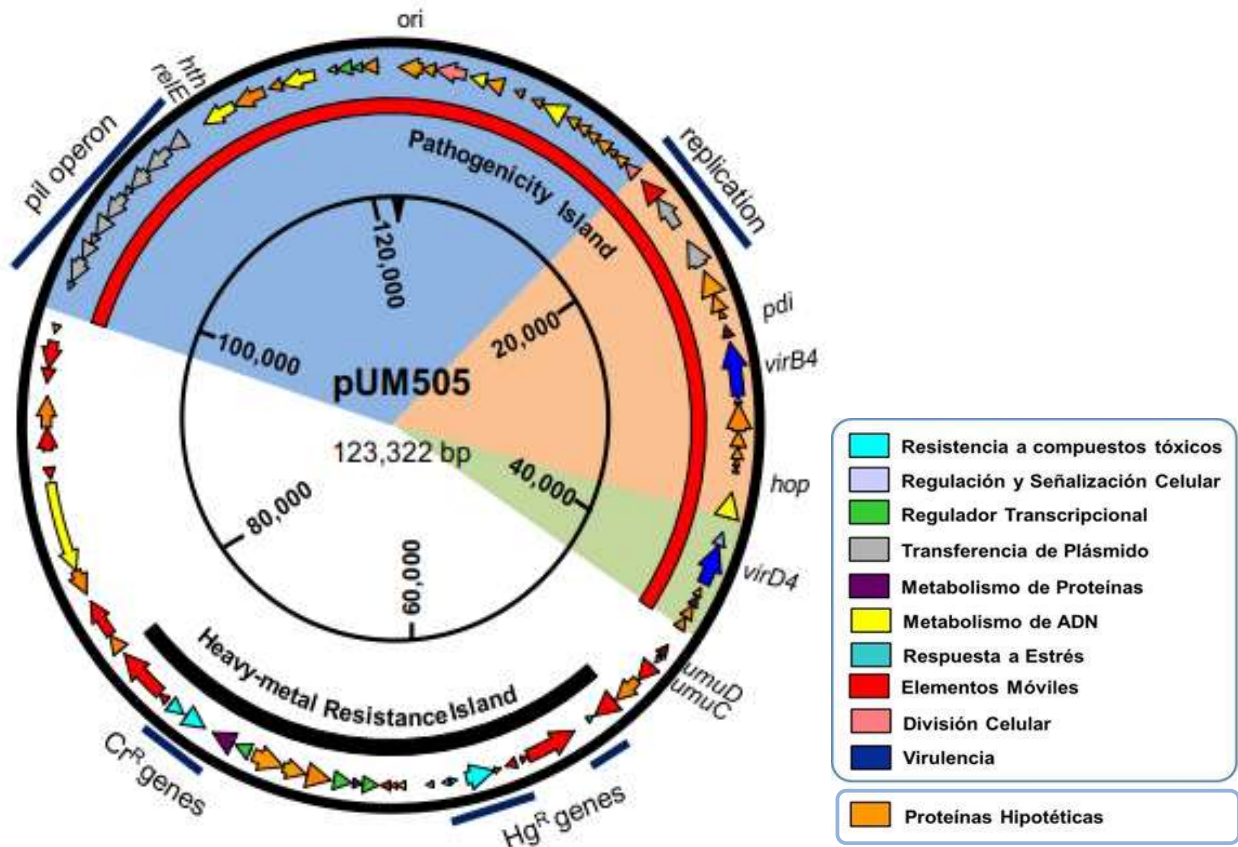


Figura 7. Mapa genético del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Las regiones codificantes se muestran con flechas o puntas de flecha, indicando la dirección de la transcripción. Las posibles funciones asignadas de las proteínas codificantes se agrupan de acuerdo a los diferentes colores mostrados en el cuadro de la derecha, indicando también las proteínas hipotéticas. La isla de patogenicidad (PAI) se muestra con una barra roja y la isla de resistencia a metales pesados con una barra negra. Se indica el origen de replicación (ori) y con barras azules las regiones relacionadas con la transferencia, replicación, resistencia a mercurio (Hg^R) y resistencia a cromato (Cr^R). Los bloques de estructura de mosaico se representan como regiones de colores azul, naranja y verde. (Modificado de Ramírez-Díaz y col., 2011).

genomas de las bacterias patógenas y ausentes en los genomas de un representante no patógeno de la misma especie o de una especie estrechamente relacionada, iii) tiene un tamaño de 10 a 200 kb, iv) difieren al resto del genoma en el contenido de guanina y citosina (G + C), v) se localizan con frecuencia junto a genes de ARNt, vi) a menudo están flanqueados por repeticiones directas de 16 a 20 pb, vii) presentan genes de elementos móviles tales como: elementos de inserción, integrasas, transposasas, orígenes de replicación de plásmidos, viii) a menudo son inestables y ix) suelen representar estructuras en forma de mosaico en lugar de segmentos homogéneos de ADN adquirido horizontalmente (Schmidt y Hensel, 2004).

2.3.1 Isla de patogenicidad de pUM505

La isla de patogenicidad de pUM505 consta de 78 *orfs* (*orfs* 1–51 y 112–138) de los cuales, 64 se han encontrado en las islas de patogenicidad PAPI-1 y PAPI-2 de *P. aeruginosa* PA14, un aislado clínico altamente virulento, razón por la cual esta región es considerada como una isla de patogenicidad (He y col., 2004). La PAI de pUM505 muestra una estructura tipo mosaico que consiste en muchos fragmentos de ADN que poseen gran similitud a nivel de nucleótidos con regiones cromosómicas de otras cepas patógenas o plásmidos de virulencia diferentes, así como fragmentos de secuencia sin homología (Dobrindt y col., 2002). Esta estructura, consta de tres bloques, los cuales están relacionados en secuencia y organización genética con grupos de genes en la isla PAPI-1 de *P. aeruginosa* PA14 (He et al., 2004).

En esta PAI se identificó a los genes *pumA* y *pumB* (*orfs* 123 y 124 respectivamente) que codifican a un sistema TA (toxina-antitoxina), donde la proteína PumB contrarresta los efectos tóxicos de la toxina PumA, la cual tiene el potencial de promover la virulencia de PAO1 contra el nematodo *Ceanorabditis elegans* y ratones cuando se expresa en ausencia de PumB. Esta es la primera descripción, hasta donde se sabe, de un sistema TA codificado por un plásmido que confiere estabilidad al mismo y además codifica una toxina con la posible capacidad de aumentar la virulencia de *P. aeruginosa* (Hernández y col., 2017).

2.4 Participación del plásmido pUM505 en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1

Para determinar si el plásmido pUM505 incrementa la virulencia en bacterias se realizó la transferencia del plásmido en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y posteriormente se realizó un ensayo de virulencia, utilizando un modelo de infección en hoja de lechuga. Los resultados mostraron que la transferencia del plásmido pUM505 produjo una lesión mayor que la cepa PAO1 sin el plásmido en la hoja y que la cantidad de UFC de las lesiones incrementó cuatro veces más en el caso de la cepa PAO1 (pUM505) respecto a la cepa PAO1 sin el plásmido. Lo que sugirió, que pUM505 posee genes que participan en la virulencia de *P. aeruginosa* (Rodríguez y col., 2016) (**Figura 8**).

2.4.1 Homología del bloque de estructura de mosaico (*orfs* 22-44) de la PAI de pUM505 que incluye a los *orfs* 35-37, con la PAI PAPI-1 de *P. aeruginosa* PA14

El bloque de estructura de mosaico de la PAI de pUM505 que incluye a los *orfs* del 22 al 44, tiene un tamaño de 18.4 kb (**Figura 7, bloque naranja**), éste bloque contiene a los *orfs* 35-37 y está relacionado tanto en secuencia como en organización genética a un grupo de genes presente en la PAI PAPI-1 de *P. aeruginosa* PA14. Dentro de este bloque se identificaron genes con un papel previamente relacionados con la virulencia, como son los genes *virB4*, *virD* y *hop* (Ramírez y col., 2011).

El gen *virB4* (*orf* 34) codifica a la proteína VirB4, que presenta un 97% de similitud con componentes proteicos asociados a los sistemas de secreción tipo IV (TS4) de *P. aeruginosa* PA14 (Ramírez y col., 2011). Los sistemas TS4, se encuentran en organismos patógenos, donde median la translocación de proteínas efectoras del patógeno a la célula huésped; asimismo, son responsables de la transferencia horizontal de DNA durante la conjugación, contribuyendo a la propagación de genes de resistencia a antibióticos. VirB4 es una ATPasa citoplásmica, esencial para el ensamble del sistema y para la transferencia del sustrato, adicionalmente

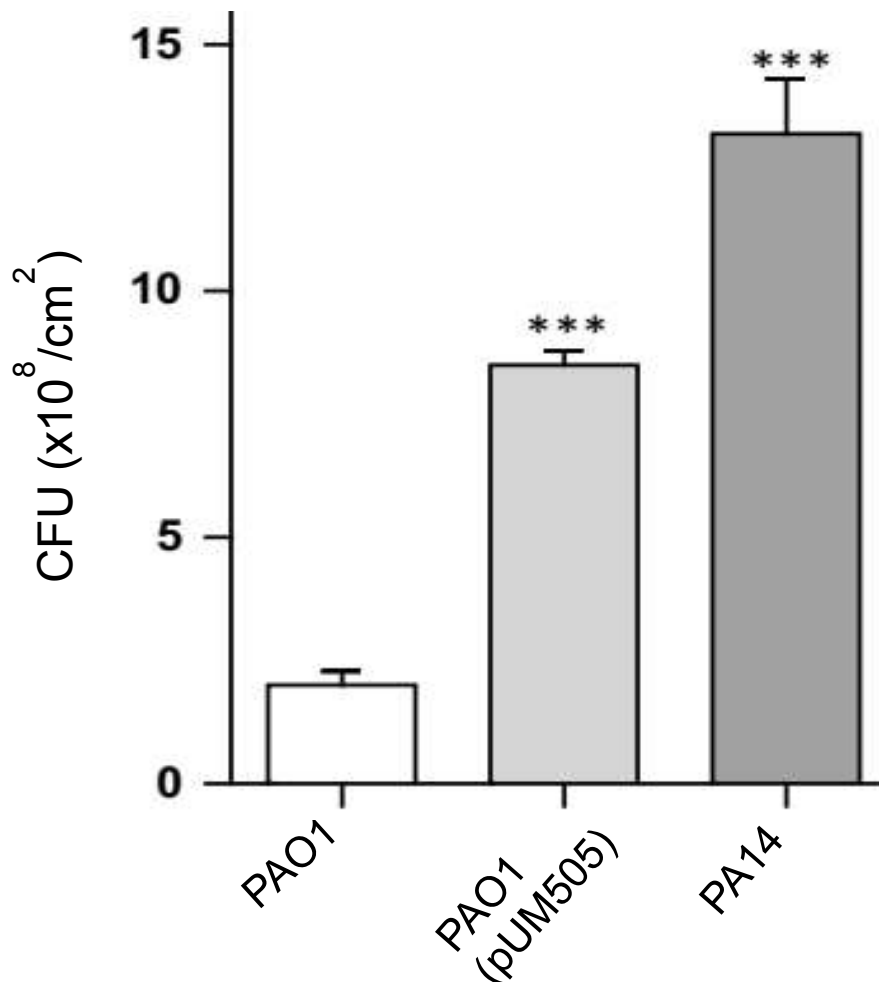


Figura 8. Virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, PAO1 (pUM505) y PA14 en un modelo de infección de hojas de lechuga. Se muestran las unidades formadoras de colonias (UFC) determinadas a partir de áreas de lesión de hojas de lechuga infectadas con las cepas bacterianas. Los datos son las medias de seis experimentos independientes con la desviación estándar (DE) mostrada. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (PAO1) están indicadas por *** $P \leq 0.001$ (Prueba de Tukey) (modificado de Rodríguez y col., 2016).

participa en la biogénesis del *pili*. VirB4 es el componente más conservado del sistema TS4 (Walldén y col., 2012).

Por lo que concierne al gen *hop* (*orf 42*), este codifica a una proteína que presenta 98% de similitud con una proteína Hop involucrada en el sistema de secreción tipo III (TS3) de *P. aeruginosa* PA14 (Ramírez y col., 2011). Los sistemas TS3, permiten que patógenos humanos, vegetales y animales inyecten toxinas en el citoplasma de las células eucariotas (Izoré y col., 2011). Nuestro grupo de trabajo llevo a cabo la clonación y posterior transferencia del *orf 42* a cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*, posteriormente evaluó la virulencia realizando ensayos en hojas de lechuga, determinando que el producto de este gen incrementa la virulencia y la proliferación de ambas cepas bacterianas (Rodríguez y col., 2016).

En *P. syringae*, el gen *hop* codifica para un efector tipo III, lo que causa daño a la planta del tomate, debido a que *P. syringae* es patógena para la misma, también se demostró que la eliminación de *hop* reduce la formación de hojas necróticas en las hojas del tomate (Lindeberg, 2004).

2.5 Participación del plásmido pUM505 en la resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa* PAO1

Nuestro grupo de trabajo transfirió el plásmido pUM505, por conjugación, a una cepa de *P. aeruginosa* PAO1, lo que en consecuencia demostró, que el plásmido confiere resistencia a las quinolonas ciprofloxacina y levofloxacina, con respecto a la cepa PAO1 que no tiene presente el plásmido. Estos resultados indicaron que pUM505 posee genes que confieren resistencia a quinolonas (Díaz y Magaña, 2011) (**Figura 9**).

2.5.1 Identificación de genes de pUM505 que participan en la resistencia a quinolonas

Con la finalidad de identificar genes del plásmido pUM505 que participaran en la resistencia a quinolonas, se realizó un análisis *in silico* de la predicción de estructura y localización de las secuencias de 64 proteínas hipotéticas codificadas

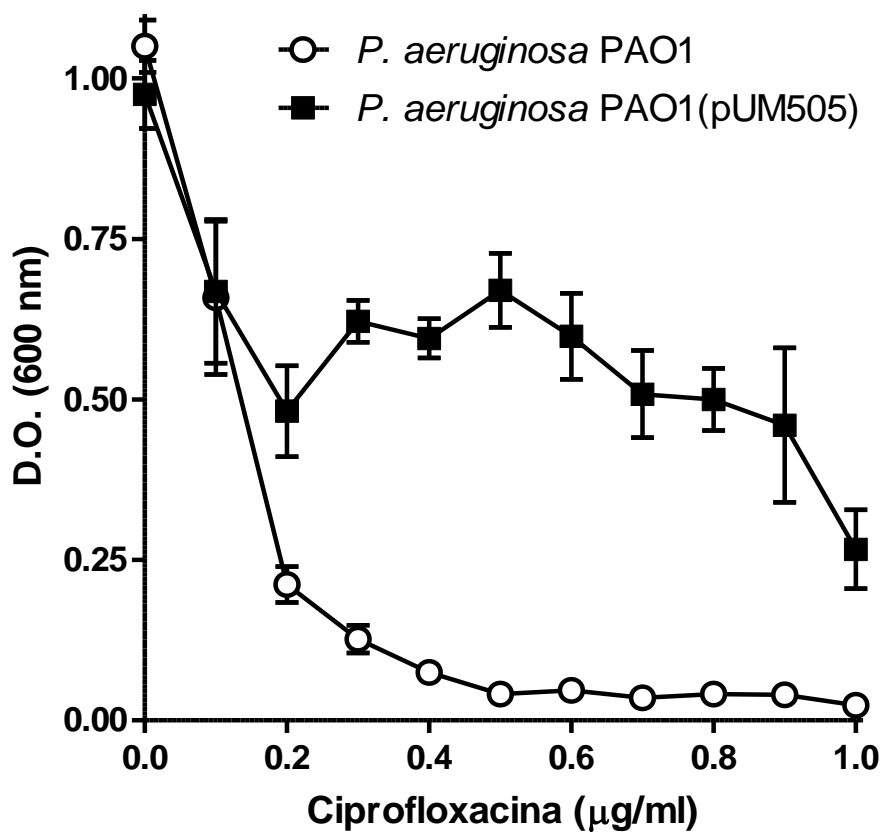


Figura 9. Resistencia a ciprofloxacina conferida por el plásmido pUM505. Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitación constante. Posteriormente se midió la absorbencia a 590 nm, *P. aeruginosa* PAO1 (o) y *P. aeruginosa* PAO1 (Pum505) (●). Se muestran barras de error estándar de la media, n=6 (Díaz, 2011).

por genes de este plásmido, usando como criterio de selección la búsqueda de probables proteínas de membrana y periplásmicas que pudieran estar participando en la resistencia a quinolonas mediante un sistema de expulsión, puesto que es el mecanismo más común de resistencia descrito en *Pseudomonas*.

Los genes de *P. aeruginosa* que codifican proteínas membranales y periplásmicas que participan en la resistencia a quinolonas reportados, se encuentran agrupados en operones (Wong y Kassen, 2011). De manera inicial, se seleccionaron los *orfs* 35, 36 y 37 ya que se determinó que los *orfs* 36 y 37 forman parte de un probable operón de 11 genes, donde también se localiza el *orf* 35 que codifica a una proteína que posee 95% de identidad con una lipoproteína de *P. aeruginosa* PA14 (Ramírez y col., 2011) (**Figura 10**). Proteínas homologas a la codificada por el *orf* 35 participan en mecanismos membranales de resistencia a quinolonas (Yoneyama, 2000). Mediante análisis *in silico*, se predijo que el *orf* 35 y el *orf* 36 codifican proteínas de probable localización en membrana interna, mientras que la proteína codificada por el *orf* 37 se predice que es de localización periplásmica, por lo que se propuso que estas proteínas podrían estar formando un sistema de transporte, que lleve a las quinolonas hacia el medio extracelular (Rojas, 2012).

2.5.2 Resistencia a quinolonas conferida por los *orfs* 35-37 en *E.coli* J53-2

Los *orfs* 35, 36 y 37, se clonaron en conjunto en el vector de expresión binario pUCP20 y se transfirieron a la cepa de *E.coli* J53-2, lo que dio como resultado un incremento en la resistencia a quinolonas como ciprofloxacina y levofloxacina, en comparación a la cepa sin el plásmido recombinante que contiene a estos *orfs* (Rojas, 2012) (**Figura 11**).

Los *orfs* 35-37 clonados en el vector pUCP20 también se transfirieron a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, sin embargo, no se observó un aumento en la resistencia a ciprofloxacina en esta cepa, estos resultados sugirieron que la resistencia conferida por los *orfs* 35-37 no es lo suficientemente elevada para influir en la resistencia a quinolonas de *P. aeruginosa* PAO1. De forma adicional, se sugirió que los *orfs* 35-37 se localizan en un posible operón de 11 genes, sugiriendo que

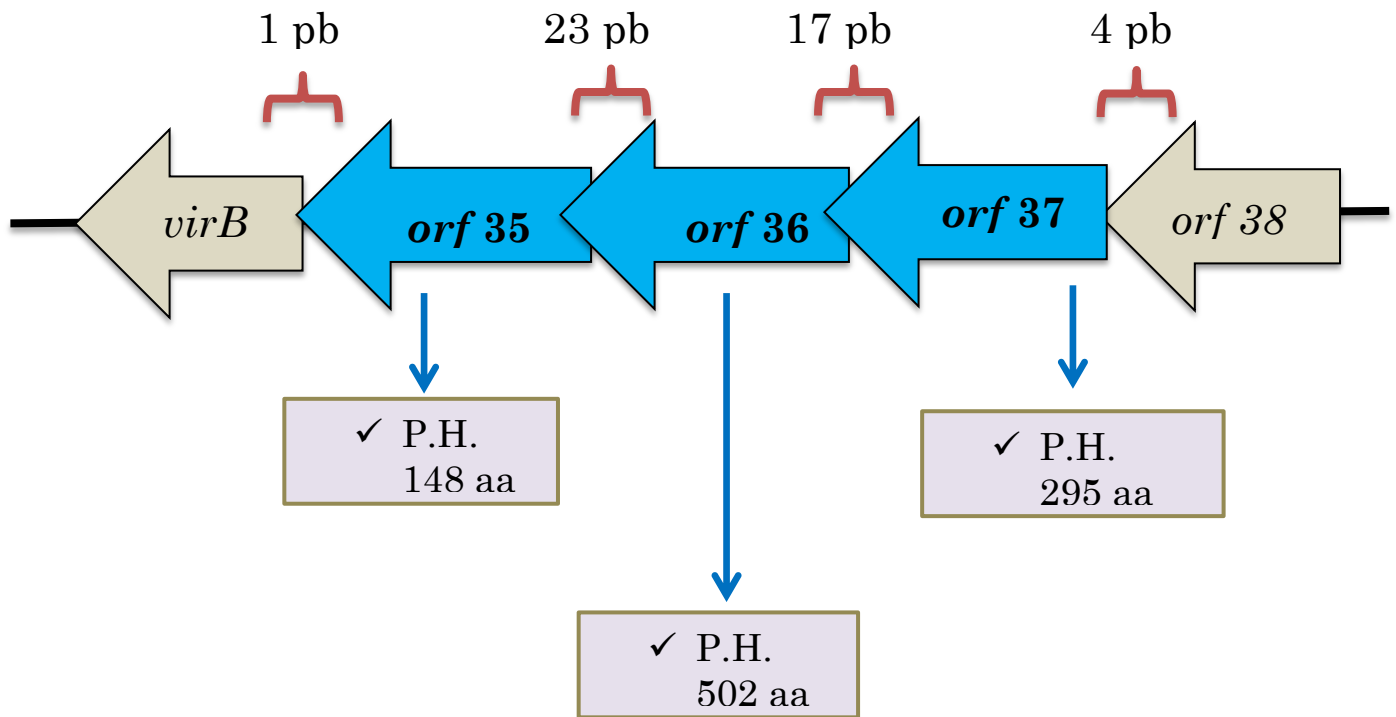


Figura 10. Arreglo genómico de los *orfs* 35, 36 y 37 de la PAI de pUM505. Las flechas en color azul representan a los *orfs* 35, 36 y 37, los cuales codifican a proteínas hipotéticas de 148, 502 y 295 aminoácidos respectivamente, las flechas en gris indican los *orfs* aledaños a los *orfs* 35-37. El sentido de las flechas hacia la derecha, demuestran que los *orfs* están codificados por la cadena de DNA complementaria y los corchetes señalan el número de pares de bases por los que estos *orfs* están traslapados.

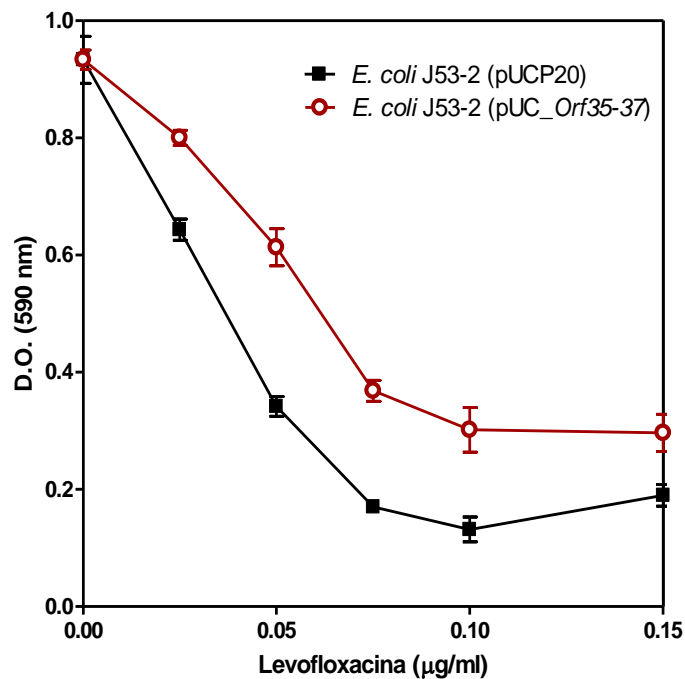
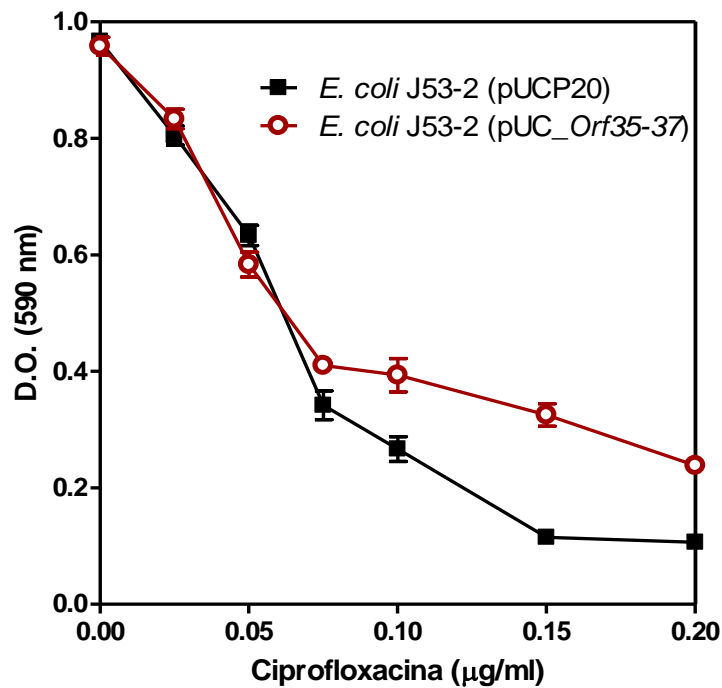


Figura 11. Susceptibilidad a ciprofloxacin y levofloxacin de *E. coli* J53-2 (pUC_orfs 35-37). Los cultivos se crecieron en CN por 18 h a 37°C con agitaci3n constante. Posteriormente se midi3 la absorbencia a 590 nm, *E.coli* J53-2 (o) y *E.coli* J53-2 (pUC_orfs 35-37) (●). Se muestran barras de error est3ndar de la media, n=6 (Rojas, 2011. Tesis de licenciatura)

genes adyacentes a los *orfs* 35-37 son necesarios para conferir un fenotipo de resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa*.

3. JUSTIFICACIÓN

La PAI de pUM505 posee genes de virulencia conservados en islas de patogenicidad de asilados clínicos altamente virulentos. Los *orfs* 35, 36 y 37 que forman parte de la PAI confieren resistencia ciprofloxacina y levofloxacina cuando son transferidos a la cepa de *E. coli* J53-2. Estos *orfs* en conjunto con otros genes forman parte de un bloque de estructura de mosaico de la PAI de pUM505 relacionado en secuencia y organización genética a un grupo de genes localizado en la isla PAPI-1 de *P. aeruginosa* PA14, un asilado clínico altamente virulento; sin embargo, su función en la virulencia de *P. aeruginosa* no ha sido dilucidado.

Por tal razón, es de interés determinar si los *orfs* 35, 36 y 37 en conjunto con otros genes de la PAI constituyen sistema de resistencia a antibióticos que además participa en la virulencia de la bacteria.

4. HIPÓTESIS

Las proteínas codificadas por los *orfs* 35, 36 y 37 de la PAI del plásmido pUM505 forman parte de un grupo de genes que codifican a un sistema de resistencia a quinolonas e incrementan la virulencia bacteriana.

5. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar si los *orfs* 35, 36 y 37 de la PAI de pUM505 forman parte de un operón que codifica a un sistema de resistencia a antibióticos y de virulencia.

Objetivos específicos:

- I. Determinar si los *orfs* 35, 36 y 37 del plásmido pUM505 constituyen o forman parte de un operón.
- II. Determinar si el producto de los *orfs* 35, 36 y 37, así como de genes aledaños confieren resistencia a quinolonas.
- III. Establecer si el producto de los *orfs* 35, 36 y 37, así como de genes aledaños participan en la virulencia.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Objetivo I

Realizar el análisis *in silico* de la región del DNA que flanquea a los *orfs* 35, 36 y 37



Determinar el contexto genómico de la región del DNA que incluye a los *orfs* 35, 36 y 37



Evaluar mediante RT-PCR la presencia de un RNAm policistrónico

Objetivo II

Transformar en *E. coli* J53-3 con plásmidos recombinantes que contengan los *orfs* 35,36 y 37 y genes aledaños de forma individual y en conjunto



Determinar la resistencia a antibióticos mediante curvas de susceptibilidad

Determinar la resistencia a antibióticos mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC)

Objetivo III



Realizar ensayos de virulencia empleando los modelos de lechuga y *Caenorhabditis elegans*

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo o sus componentes se adquirieron de los laboratorios Bioxon de México S. A., Merck-México S.A. o Sigma Chemical Corporation.

- I. Caldo Luria Bertani (CL): NaCl (J. T. Baker) 1%, peptona de caseína (Bioxon) 1% y extracto de levadura (Becton Dickinson) 0.5%.
- II. Agar Luria Bertani (AL): al CL se le agrego 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon).
- III. Caldo nutritivo (CN): peptona de gelatina 0.5% y extracto de carne de res 0.3% (Bioxon).
- IV. Agar nutritivo (AN): al CN se le agrego 1.5% de agar bacteriológico (Bioxon).
- V. Medio mínimo M9 (M9): sales minerales M9 (Sigma), glucosa 20 mM, CaCl₂-2H₂O 0.1 mM y MgSO₄-7H₂O 2 mM (Sambrook y col., 1989).

7.2 Cepas utilizadas

- 1) *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505): Cr^R, Hg^R. Cepa que se utilizó para obtener el DNA molde para la amplificación por PCR de los *orfs* 33 al 42.
- 2) *E. coli* JM101 [F⁻, traD36, proAB, lacIqDM15], thi, D (lac-proAB) (Yanisch-Perron y col., 1985): Cepa receptora de los plásmidos recombinantes derivados de los vectores pJET1.2/Blunt y pUCP20. También se empleó como control en los ensayos de resistencia y determinación de la MIC.
- 3) *E. coli* J53-3: Cepa receptora de los plásmidos recombinantes derivados del vector pJET1.2/Blunt y pUCP20. También se empleó como control en los ensayos de resistencia y determinación de la MIC.

7.3 Plásmidos y vectores empleados

- a) pUM505 (Cervantes y col., 1986): Plásmido conjugativo, confiere resistencia a Cr^R, Hg^R y Cp^R (**Figura 7**).
- b) pJET 1.2/Blunt (Fermentas): Vector que se utilizó para la recuperación de productos de PCR y para ensayos de resistencia, confiere resistencia a Ap^R (**Figura 12**).
- c) pUCP20 (West y col., 1994): Vector binario que se utilizó para la expresión de los genes de interés, confiere resistencia a Ap^R y Cb^R (**Figura 13**).

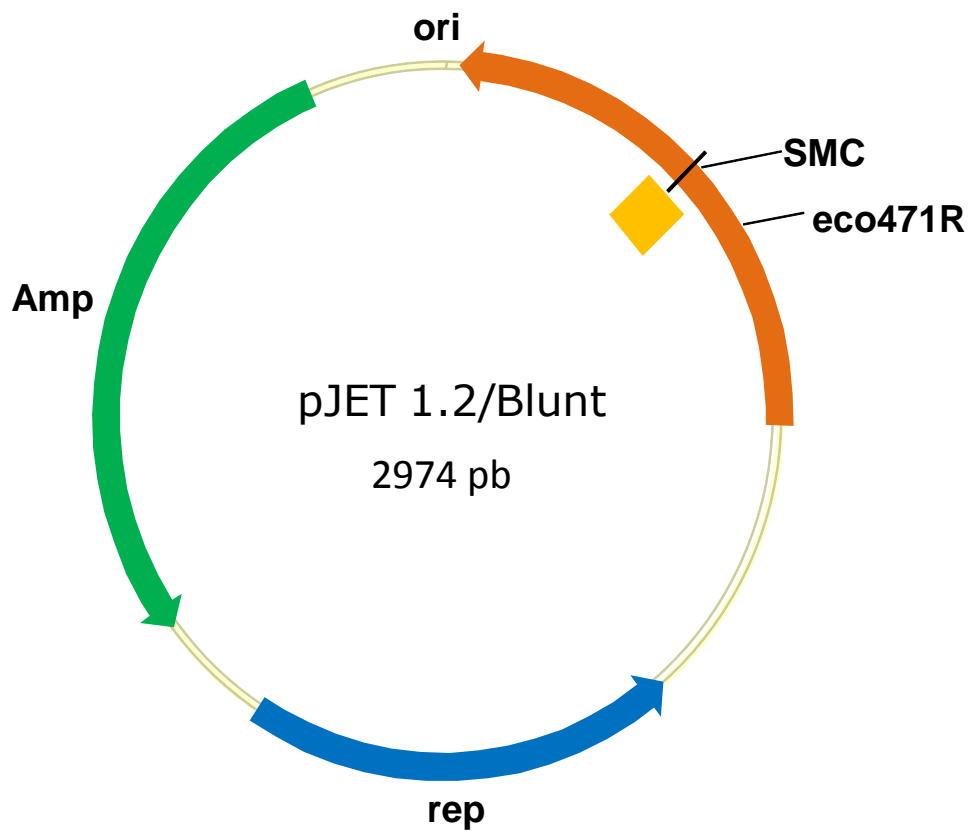


Figura 12. Vector pJET 1.2. El vector de clonación pJET 1.2/Blunt tiene un tamaño de 2974 pb. Posee un origen de replicación para *E. coli* (ori) y un gen letal *eco471R* que permite la selección positiva de las transformantes con el inserto en el vector. Contiene un gen de resistencia a ampicilina (Amp) y un sitio de clonación múltiple (SMC) (Fermentas).

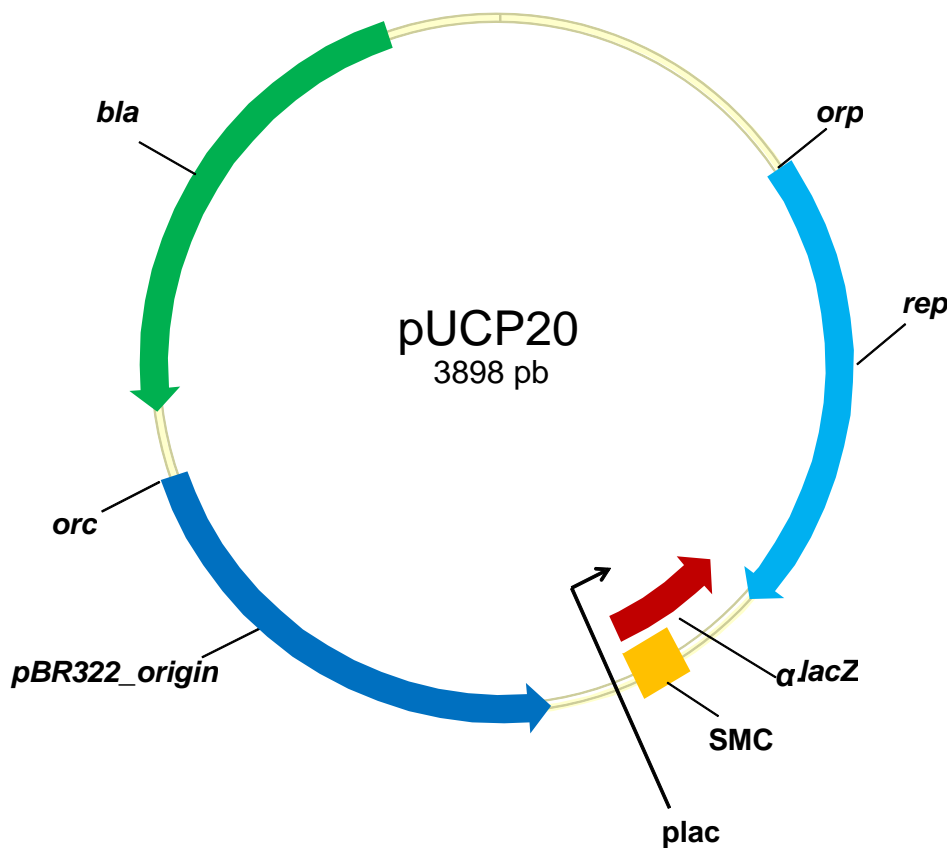


Figura 13. Vector de clonación pUCP20. El vector tiene un tamaño de 3898 pb, con el gen *bla* de resistencia a ampicilina y carbenicilina; orígenes de replicación para *E. coli* (*orc*) proveniente del plásmido pBR322 (*pBR322_origin*) y *P. aeruginosa* (*orp*); el gen *rep*, que codifica una proteína implicada en la replicación en *Pseudomonas*; α -*lacZ*, una parte del gen que codifica la β -galactosidasa; el promotor *plac* y un sitio múltiple de clonación (SMC) (Modificado de West y col., 1994).

7.4 Oligonucleótidos empleados

Se utilizaron parejas de oligonucleótidos específicos diseñados con base en la secuencia del plásmido pUM505 para la amplificación del operón que contiene a los *orfs* 33 al 42. Las secuencias de los oligonucleótidos y sus características se enlistan en la **Tabla 1**, también se muestran las condiciones empleadas en la **Tabla 2**.

Para amplificar los *orfs* individuales del operón se diseñaron los oligonucleótidos mostrados en la **Tabla 3**.


En la **Tabla 4** se muestran los oligonucleótidos diseñados para evaluar la expresión de las regiones sobre puestas de los *orfs* del operón por RT-PCR. Las condiciones empleadas se describen en la **Tabla 5**.

En la **Tabla 6** se indican las condiciones empleadas para llevar a cabo la amplificación de las regiones intergénicas del operón realizando una PCR convencional, utilizando los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 4**.

7.5 Análisis de secuencias

Se realizó la búsqueda de secuencias a través del servidor NCBI (National Center for Biotechnology Information). Se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para elaborar alineamientos de las secuencias de interés con las bases de datos. Mediante el programa BPROM (Prediction of bacterial promoters) se realizó el análisis de probables promotores. Se determinó la probable estructura secundaria de las proteínas codificadas por los *orfs* 33-42 mediante el programa MINNOU.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en para la amplificación del operón (orfs 33-42) por PCR.

Orf	Oligonucleótido	Secuencia 5'  3'	Tamaño
33-42	OD OPI	AGCGCTT <u>G</u> CAT <u>G</u> CGAGCATTACAT	9,218 pb
	OR OPI	CAAGGGCGTCGCA <u>AAGCTT</u> CAAACAC	

Se indica la secuencia y el sentido de los oligonucleótidos empleados: OD (directo), OR (reverso). Se subrayan los sitios de restricción para las enzimas *SphI* y *HindIII* introducidos en la secuencia de oligonucleótidos. Oligonucleótidos usados para clonar en PJET 1.2/Blunt y subclonar en pUCP20.

Tabla 2. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR (herculasa II).

		Temperatura	Tiempo
Condiciones de amplificación (30 ciclos)	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
	Desnaturalización	95°C	20 seg
	Alineamiento	55°C	20 seg
	Extensión	72°C	4 min 45 seg
	Extensión final	72°C	4 min

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de los orfs del operón

Oligonucleótido	Enzima	Tm °C	Secuencia 5'-----3'
OD42-33	BamHI	63.2	GAT CGG CAA TCA AGG ATC CCA AGG CTG
OR42-33	HindIII	63.9	GGA TGC AGC AAG CTT GAT CAG CAG CAG
OR42	HindIII	62.9	CAG CAG GAG AAA GCT TAT CGC TGC TCC
OR41	HindIII	63.6	CCA AAG CTT CAC CTG GGA GTG CCA AAG
OR40	HindIII	63.5	CCA GTG GAA AGC TTG CAG CGT TAC CTG
OR39	HindIII	63.7	CCA TGC ACA AGC TTC CGG TGA TGA ACC
OR38	HindIII	63.9	CCA GCG CAG AAT CTC CAA AGC TTG TGC
OR37	HindIII	62.5	CCA GGG TTG AAG CTT CTT CCG ACG TTA C
OR36	HindIII	62.7	GCT GTT GCC TAA CAA GCT TGT TGC ACC
OR35	HindIII	63.6	CAG CCT GCG AAG CTT CAT TCT TGC TCC
OR34	HindIII	62.6	GGA GCG CAT ATC CTA AGC TTC TGC AGG
OD41	BamHI	63.9	CTT CTA CTT CGG ATC CTC ACG CCT GGC
OD40	BamHI	63.9	GTT TCC GCG ATA CGG ATC CTG GTC CTC
OD39	BamHI	63.7	CTT GGG ATC CCT ACG GCA CCT ATC ACG
OD38	BamHI	64.0	CTG ACA CCT GGT TCT GGA TCC AGG TGG
OD37	BamHI	62.2	GAT ACG CCT CAA CGG ATC CAA CTC GAG
OD36	BamHI	63.8	GAC CTT CCA GGA TCC GTA CTT GGG AGC
OD35	BamHI	62.5	CTC AGG ATC CGC AAG GTC GAT TAC AGC
OD34	BamHI	62.6	CTG GTC ATG TAT GTG GAT CCG CAC CTG
OD33	BamHI	62.8	CCT TCC GGA TCC ATT TCC CAG ACC AAC

Se indica la secuencia y el sentido de los oligonucleótidos empleados: OD (directo), OR (reverso). Se sombrea en amarillo los sitios de restricción para las enzimas *BamHI* y *HindIII*, introducidos en la secuencia de oligonucleótidos. Oligonucleótidos usados para clonar en PJET 1.2/Blunt y subclonar en pUCP20.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la RT-PCR

Oligonucleótido	Tamaño esperado (pb)	Secuencia 5'-----3'
OD 32-33	454	GAT GCC CTG CAG ACG CTC AGG ATA TG
OR 32-33		CTG TCT ACC CAG CGC TTC AGT CGT G
OD 33-34	430	CAA GGA GTA CCT CTT CCG TGT GGT TC
OR 33-34		GTG GAT GCT GTT GCA GCC ATT CAT C
OD 34-35	391	CCA GCA ACG AGA TTC ACA GCC AG
OR 34-35		GTC GTG ATC GTA GAG GCG TGA CG
OD 35-36	285	GCAGTGGATGAACAAGCTGTACG
OR 35-36		GTT CAC AGA CGT CGA GCA TGT TG
OD 36-37	300	CGA CAC CAC TAC CGT GTA CTT GG
OR 36-37		CCA CGA TGG TGA GTA GTG TGT CG
OD 37-38	366	CAG CAC TCG ATC AAT GAC TGG AC
OR 37-38		CGA CGA ATA CAA TGC GTT CCT GG
OD 38-39	415	CAG GTA ACG CTG CCT GCA TTC CAC TG
OR 38-39		GAC ACT CTC TGG CGG AAT GTC CCA C
OD 39-40	412	GCA AAC CAT CCA GAA CTT CGG CTA TG
OR 39-40		CAG GCA GAG TTA CCT GCG ACC AAA G
OD 40-41	357	GTT CAT TGG AGC AGC GAT GAC CTT TC
OR 40-41		CAT CGC TCC GTC ATA GCC GAA GTT C
OD 41-42	391	GAG GTG ATG ATC CGG CAG CTC AAC G
OR 41-42		CTG TCG AGG TTG TTG GTG GCC CAG
OD 42-43	454	GAA GGC TGG GAG CTG GTG AGC GTT C
OR 42-43		CAG CGG CCA GGC GTG AGT AGT CGA AG

Se indica la secuencia y el sentido de los oligonucleótidos empleados: OD (directo), OR (reverso). Oligonucleótidos empleados para analizar por RT-PCR las regiones sobrepuesta (intergénicas) de los *orfs* del operón.

Tabla 5. Condiciones empleadas para la RT-PCR.

Ciclos		Temperatura	Tiempo
1	Activación de la Transcriptasa reversa	40°C	60 min
1	Desnaturalización inicial	95°C	2 min
40	Desnaturalización	95°C	30 seg
	Alineamiento	55°C	30 seg
	Extensión	72°C	1 min
1	Extensión final	72°C	5 Min

Tabla 6. Condiciones empleadas para la amplificación de las regiones intergénicas por PCR.

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

7.6 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 CN durante 18-20 h a 37°C con agitación constante se centrifugó durante 2 min a 12000 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 incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a otro tubo. Se adicionaron 500 µL de la mezcla fenol:cloroformo (1:1), se mezcló moderadamente y se centrifugó durante 10 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa superior, se le adicionó 1 mL de etanol absoluto frío y se incubó durante 20 min a -80°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. El sedimento se lavó dos veces con 500 µL de etanol al 70% centrifugando durante 5 min a 12000 rpm entre cada lavado, se recuperó el sedimento y se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla de DNA obtenida en 50 µL de agua desionizada y estéril. Se adicionó 5 µL de RNasa (Promega) y se incubó 30 min a 37°C. Posteriormente se inactivó la RNasa incubando 15 min a 65°C. Las muestras se almacenaron a -20°C y se sometieron a corrimientos electroforéticos en geles de agarosa.

7.7 Aislamiento de DNA plasmídico por el método de Casse

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

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

7.8 PCR (Herculasa)

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con base a la secuencia de las regiones aledañas de los *orfs* 33 y 42 (**Tabla 1**). Se utilizó el kit comercial Herculase II Fusión Enzyme de Agilent Technologies, el protocolo se ajustó a como se describe a continuación:

Se realizó una mezcla de reacción con los siguientes componentes (se describe el orden en el que se colocaron en el tubo para PCR): DMSO (1%) 2.5 μ L, H₂O, 13.5 μ L, Buffer 5X 5.0 μ L, Mezcla dNTP 0.5 μ L, DNA plasmídico de *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) 0.5 μ L oligonucleótidos directo y reverso a una concentración de 10 picomoles y la enzima Herculasa II 1.0 μ L. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 25 μ L. El proceso se realizó empleando un termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cyce, utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 2**.

7.9 Extracción de RNA

Se utilizó el kit comercial SV Total RNA Isolation System de promega, de acuerdo al siguiente protocolo:

Se creció un cultivo bacteriano de *P. aeruginosa* PAO1 (pUM505) en 25 mL de medio y a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6. Se centrifugaron 4 mL durante 2 min hasta formar una pastilla. Se colocaron 175 µL del buffer de lisis de RNA y 350 µL del buffer de dilución de RNA. Se mezcló por inversión cuatro veces. Se colocó a 70°C por 3 minutos. Se centrifugó 10 min a 12000 rpm a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se desechó, teniendo precaución de no desechar la pastilla y a esta última se adicionaron 250 µL de etanol al 70%. Se mezcló suavemente y se transfirió a la columna. Se centrifugó por 1 min, a 12000 rpm y a temperatura ambiente. Se desechó el líquido del tubo colector. A la columna se agregó 600 µL de la solución de lavado de RNA y se centrifugó nuevamente por 1 min a 12000 rpm, a temperatura ambiente. Se desechó el líquido del tubo colector y se añadió a la columna 50 µL de una mezcla de incubación de DNasa preparada con: 40 µL del buffer amarillo, 5 µL de MgCl₂ y 5 µL de DNasa I. Se incubó por 15 min de 20-25°C. Se adicionó 200 µL de la solución stop de DNasa y se centrifugó por 1 min a 12000 rpm y a temperatura ambiente. Se desechó el líquido del tubo colector. Se agregó 250 µL de la solución de lavado de RNA. Se centrifugó por 2 min a 12000 rpm y a temperatura ambiente. Se desechó el líquido del tubo colector. Se transfirió la membrana a un tubo eppendorf y se adicionaron 100 µL de agua libre de nucleasas. Se centrifugó por 2 min a 12000 rpm a temperatura ambiente para eluir el RNA y finalmente se almacenó a -80°C.

7.10 RT-PCR

Para la obtener el DNAc se siguió el siguiente protocolo:

En un tubo de microcentrífuga se colocaron 2 µg del RNA total y 1 µL del oligonucleótido reverso de la región intergénica *orfs* 38-37 (50 picomoles) de la región intergénica **Tabla 4**. Se llevó a volumen final de 15 µL con agua libre de

nucleasas. Se colocó a 70°C durante cinco min. Inmediatamente se enfrió en un recipiente con hielo. Se añadió buffer de reacción RNA 5X, mezcla de dNTP, inhibidor de RNasa y Transcriptasa reversa (200 U/mL). El proceso se realizó empleando un termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cyce, utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 5**.

7.11 PCR

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados con base a la secuencia de las regiones intergénicas de los *orfs* 33-42 (**Tabla 4**). Se hizo una mezcla que contenía: DNA (~100 ng), oligonucleótidos directo y reverso a una concentración de 10 picomoles, 12.5 µL de la mezcla de reacción Master Mix (Promega) que contiene la enzima *Taq* polimerasa, MgCl₂, dNTPs y un amortiguador de reacción a concentraciones optimizadas. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 25 µL. El proceso se realizó empleando un termociclador MultiGene™ Gradient Thermal Cyce, utilizando las condiciones descritas en la **Tabla 6**.

7.12 Electroforesis en gel de agarosa

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

7.13 Purificación de DNA de 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.

7.14 Tratamientos enzimáticos

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

7.14.1 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.

7.14.2 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.

7.14.3 Restricción con endonucleasas:

El DNA purificado se digirió utilizando una unidad de la endonucleasa de restricción (Promega) por cada µg de DNA, 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.

7.15 Preparación de células competentes en fresco

Para la preparación de células competentes de *E. coli* JM101 y J53-3 se siguió el método adaptado de Enderle y Farwell, (1988), el cual se describe a continuación:

Se crecieron los cultivos en placas de Agar durante 18-24 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 13000 rpm por 1 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó dos veces con 500 µL de agua desionizada estéril y fría. Finalmente la pastilla se resuspendió en 500 µL de agua fría desionizada estéril.

7.16 Preparación de células competentes de *E. coli*

Para la preparación de células competentes se creció la cepa *E. coli* JM101 y J53-3 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 6000 rpm a 4°C. La pastilla celular se lavó dos veces con 40 mL de agua desionizada, estéril y fría, centrifugando 10 min a 6000 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.

7.17 Transformación por el método de electroporación

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

µg/mL de carbenicilina para *P. aeruginosa*) incubándose a 37°C durante toda la noche.

7.18 Pruebas de susceptibilidad en medio líquido

De un cultivo de 4 mL de CN crecido durante la noche se tomaron 40 µL para inocular tubos con 4 mL de CN con concentraciones crecientes de ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina o moxifloxacina. Los tubos se incubaron 18 h a 37°C con agitación constante y la susceptibilidad se determinó en función de la turbidez de los cultivos al medir la absorbencia a 590 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21, Miltron Roy.

7.19 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Para determinar la MIC se utilizó el método de microdilución en caldo, de acuerdo a la metodología de la norma ISO 20776-1 “Ensayos de susceptibilidad de agentes infecciosos y evaluación del funcionamiento de los dispositivos de ensayo de susceptibilidad antimicrobiana. Parte 1: Método de referencia de microdilución en caldo para ensayar la actividad in vitro de agentes antimicrobianos frente a bacterias aerobias de crecimiento rápido implicadas en enfermedades infecciosas”.

Se preparó el antibiótico (ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina o moxifloxacina) a la concentración deseada. Se eligió el número de concentraciones del antibiótico a utilizar de tal manera que se incluyó el rango de MIC utilizando la cepa de referencia *E coli* ATCC 25922. Se realizaron diferentes diluciones en tubos con medio Mueller Hinton, con la finalidad de obtener diferentes concentraciones del antibiótico. Se preparó el inóculo resuspendiendo directamente colonias bacterianas en solución salina al 8.5% y se estandarizó midiendo la absorbancia de 0.08-0.1 a una longitud de onda de 625 nm, correspondiente al patrón de turbidez de 0.5 de la escala de McFarland y se realizó una dilución 1:10 en un tubo con medio Mueller Hinton. Se utilizó una placa de 96 pozos, en la que finalmente se realizó una en cada pocillo una dilución 1:2

(antibiótico: inóculo) colocando en cada pocillo 50 μ L de las diferentes diluciones de los antibióticos (de forma decreciente) y 50 μ L de la dilución del inóculo.

7.20 Virulencia en el modelo de nemátodo *Caenorhabditis elegans*

Se crecieron preinóculos de las cepas de interés, en medio M9 a 37 °C toda la noche. Adicionalmente, se crecieron durante 5-6 días nematodos *C. elegans*, hasta alcanzar la edad adulta, en una placa con medio NGM (medio de crecimiento de nemátodos) a 18°C. En un placa de 96 pozos, se colocó 1.5 μ L de las cepas de interés y se llevó a un volumen final de 200 μ L con medio M9, en esterilidad se adiciono 18-20 nematodos por pocillo, se cuantificó a los nematodos vivos dando un ligero toque con un asa estéril y se incubo a 18 °C durante 3 días, monitoreando la sobrevivencia de los nematodos cada 6 h, tomando como nematodos muertos aquellos que al tocarlos no tienen movimiento. Al final se graficó el porcentaje de sobrevivencia contra el tiempo en que fueron observados los nemátodos.

8. RESULTADOS

8.1 Análisis del bloque de estructura de mosaico de los *orf* 35, 36 y 37

El análisis *in silico* se realizó en el programa FGENESB que permite identificar de manera teórica operones en bacterias usando como base las distancias entre los *orfs* y las frecuencias de diferentes genes vecinos en genomas bacterianos conocidos, así como en predicción de promotores y terminadores.

Para realizar el análisis de las regiones aledañas a los *orf* 35, 36 y 37, se tomó la secuencia de todos los *orfs* del bloque de estructura de mosaico de la isla de patogenicidad de pUM505 que se extiende desde el *orf* 22 hasta el *orf* 44. Se identificó un operón de 10 genes localizado en la cadena complementaria del ADN que incluye a los *orfs* 33-42, este operón fue denominado OPcr por contener genes de resistencia a ciprofloxacina como los *orfs* 35, 36 y 37.

8.2 Búsqueda de probables promotores del operón

Una vez que se encontró que los *orfs* 35, 36 y 37 forman parte de un probable operón, el cual es codificado en la cadena de ADN complementaria, se comenzó con la búsqueda de promotores río arriba del primer *orf* del operón, el *orf* 42. El análisis se realizó en el programa BPRM, que permite el reconocimiento de promotores bacterianos sigma70 con aproximadamente un 80% de precisión y especificidad. Asimismo se utilizó el programa Virtual Footprint, el cual es específico para analizar los sitios de unión del factor de transcripción en genomas bacterianos completos.

Se identificaron dos probables promotores, un promotor tipo σ^{70} de *P. aeruginosa* y un promotor tipo σ^{Pvds} también de *P. aeruginosa*, este último promotor ha sido encontrado en genes cuyos productos participan en virulencia, como es el caso de los genes *pvdA*, *pvdD*, *pvdE*, *ptxR*, *pvcA* que están involucrados en la síntesis y secreción de pioverdina.

8.3 Análisis BLAST de las proteínas del operón

BLAST es el acrónimo de *Basic Local Alignment Search Tool*, este análisis se realizó para determinar la función de las probables proteínas codificadas por los *orfs* del operón OPcr (*orfs* 34-42). Se encontró que las probables proteínas codificadas por los *orfs* 35 al 41 tienen identidad a proteínas involucradas en procesos de conjugación, también se identificó que las probables proteínas codificadas por los *orfs* 33 y 34 poseen identidad con proteínas de secreción tipo IV, mientras que, el *orf* 42 codifica a una probable proteína Hop de secreción tipo III, todas estas probables proteínas presentan 100% de identidad a proteínas encontradas en *P. aeruginosa* **Tabla 7**.

8.4 Predicción de la estructura secundaria y probable localización de las proteínas codificadas por el operón OPcr

El análisis *in silico* se realizó en el programa MINNOU (Membrane protein IdeNtification withOUt explicit use of hydrophathy profiles and alignments) que permite identificar la estructura secundaria de una proteína, sus segmentos transmembranales y con base a ello su probable localización en la célula.

Los resultados obtenidos de estos análisis *in silico* mostraron que las proteínas codificadas por los *orfs* 33 y 34 tienen una localización citoplásmica (**Figuras 15 y 16**) y la proteína codificada por el *orf* 37 es soluble (**Figura 19**). Mientras que las proteínas codificadas por los *orfs* 36, 38, 39, 40, y 41 poseen al menos un dominio transmembranal, localizando a proteína Orf36 en la membrana externa, la proteína Orf38 como una proteína de unión a membrana, mientras que las proteínas codificadas por los *orfs* 39-41 se predice son localizadas en la membrana interna (**Figuras 18 a 23**). Finalmente el análisis predice que las proteínas codificadas por los *orfs* 35 y 42 son de secreción (**Figuras 17 y 24**). La localización celular de las proteínas codificadas por el operón OPcr sugiere que estas conforman un sistema de resistencia a quinolonas basado en la expulsión del antibiótico (**Figura 25**).

Tabla 7. Análisis BLAST de las probables proteínas codificadas por el operón OPcr

orf	Identidad (%)	Proteína	Organismo
33	100	Proteína de secreción tipo IV	<i>P. aeruginosa</i>
virB	100	VirB (Proteína de secreción tipo IV)	<i>P. aeruginosa</i>
35	100	Lipoproteína de transferencia conjugativa	<i>P. aeruginosa</i>
36	100	Elemento proteico de integración conjugativa	<i>Pseudomonas</i>
37	100	Elemento proteico de integración conjugativa	<i>P. aeruginosa</i>
38	100	Elemento proteico de integración conjugativa	<i>Pseudomonas</i>
39	100	Proteína de transferencia conjugativa	<i>P. aeruginosa</i>
40	100	Elemento proteico de integración conjugativa	<i>Pseudomonas</i>
41	100	Elemento proteico de integración conjugativa	<i>Pseudomonas</i>
hop	100	Hop (Proteína de secreción tipo III)	<i>P. aeruginosa</i>

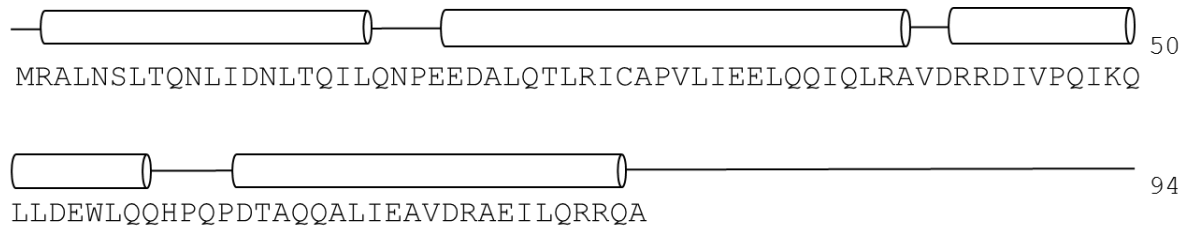


Figura 15. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el *orf* 33 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria de la proteína, en el renglón superior la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices y las flechas a láminas beta. Se predice que este *orf* codifica para una proteína de localización en citoplasma.

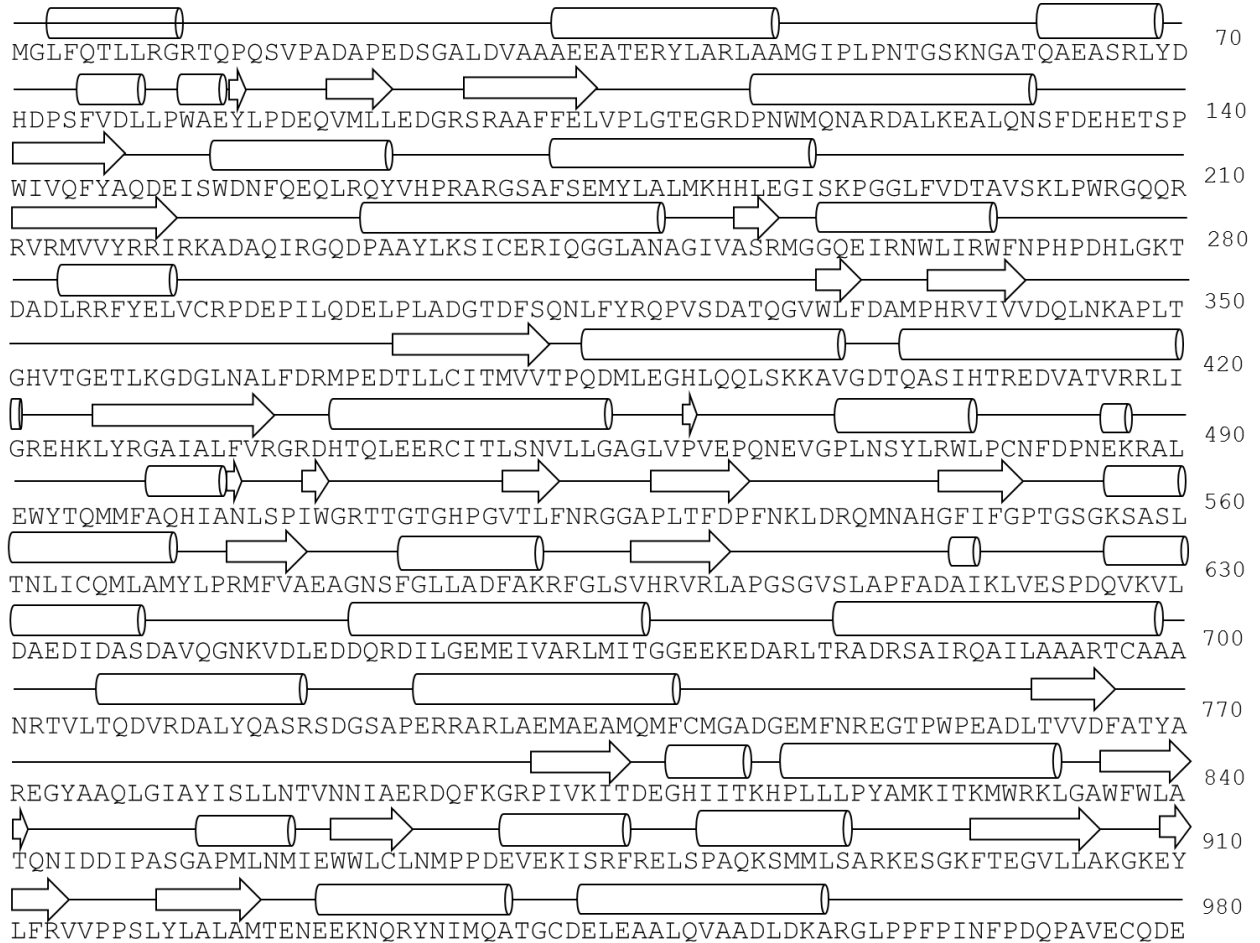


Figura 16. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el orf 34 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria, en el renglón superior la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices y las flechas a láminas beta. Se predice que este *orf* codifica para una proteína de localización en citoplasma.



Figura 17. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el orf 35 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria, en el renglón superior la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices y las flechas a láminas beta. Se predice que este *orf* codifica para una proteína de secreción.

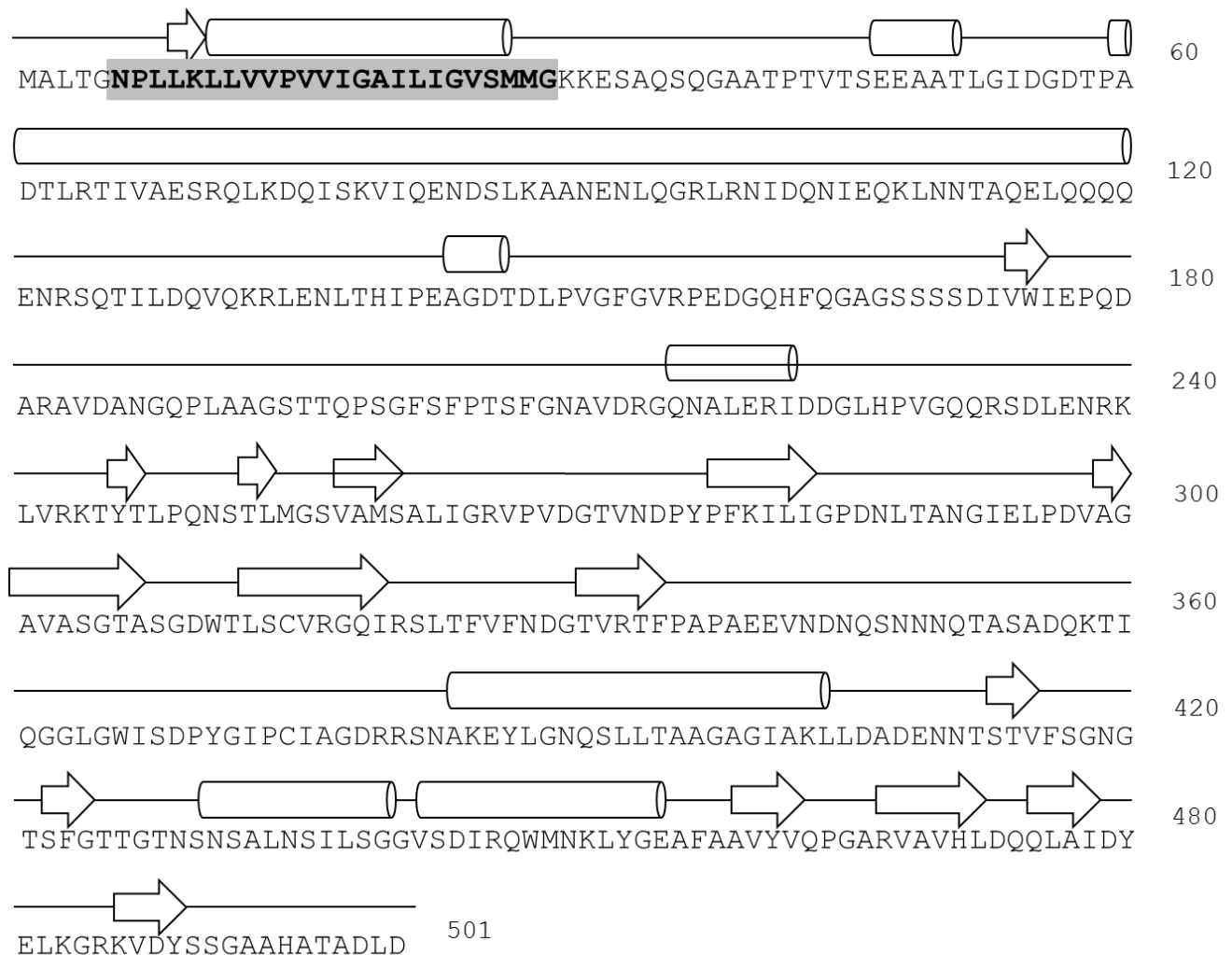


Figura 18. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el orf 36 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria, se indica con sombreado gris un segmento transmembrana; el renglón superior corresponde a la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices y las flechas a láminas beta. Se predice que este *orf* codifica para una proteína de localización en membrana externa.

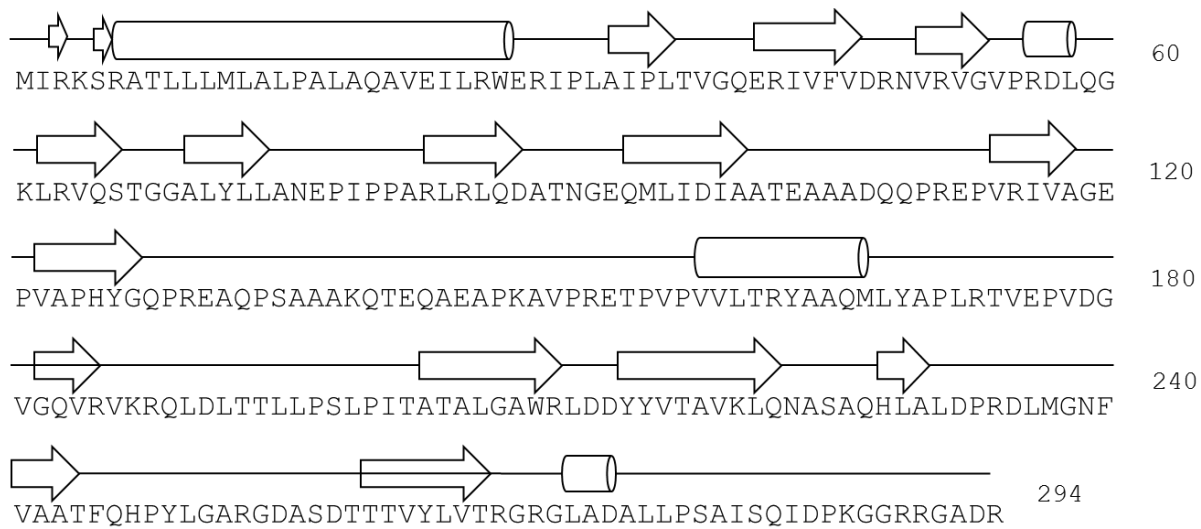


Figura 19. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el *orf* 37 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria, en el renglón superior la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices y las flechas a láminas beta. Se predice que este *orf* codifica para una proteína soluble.



Figura 20. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el *orf* 38 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria, se indica con sombreado gris un segmento transmembrana; el renglón superior corresponde a la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices y las flechas a láminas beta. Se predice que este *orf* codifica para una proteína de localización en periplasma y posee un dominio de unión a membrana.



Figura 21. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el *orf* 39 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria, se indica con sombreado gris dos segmentos transmembrana; el renglón superior corresponde a la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices y las flechas a láminas beta. Se predice que este *orf* codifica para una proteína de localización en membrana interna.

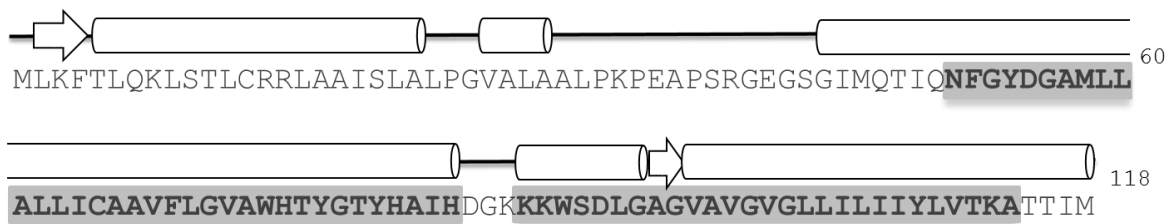


Figura 22. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el *orf* 40 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria, se indica con sombreado gris dos segmentos transmembrana; el renglón superior corresponde a la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices y las flechas a láminas beta. Se predice que este *orf* codifica para una proteína de localización en membrana interna.

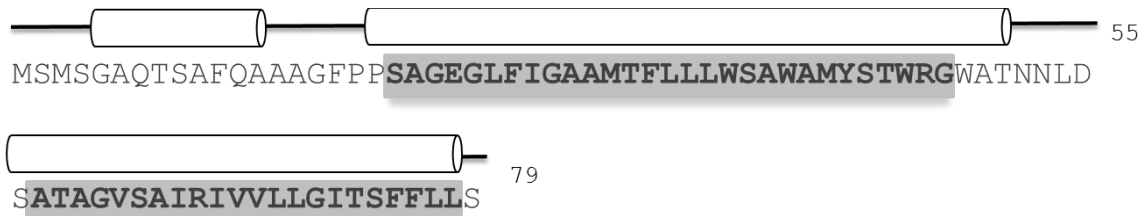


Figura 23. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el *orf* 41 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria, se indica con sombreado gris dos segmentos transmembrana; el renglón superior corresponde a la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices. Se predice que este *orf* codifica para una proteína de localización en membrana interna.

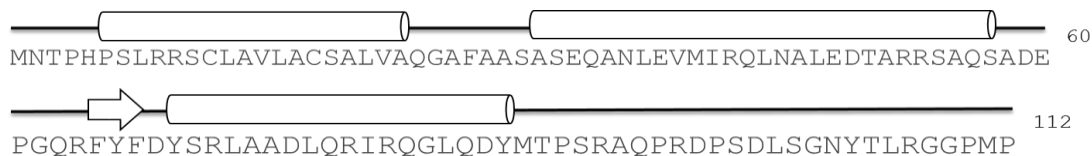


Figura 24. Predicción de estructura secundaria de la proteína codificada por el orf 42 del operón OPcr. En el renglón inferior se muestra la secuencia de aminoácidos correspondiente a la estructura primaria, en el renglón superior la estructura secundaria, los barriles corresponden a alfa hélices y las flechas a láminas beta. Se predice que este *orf* codifica para una proteína de secreción.

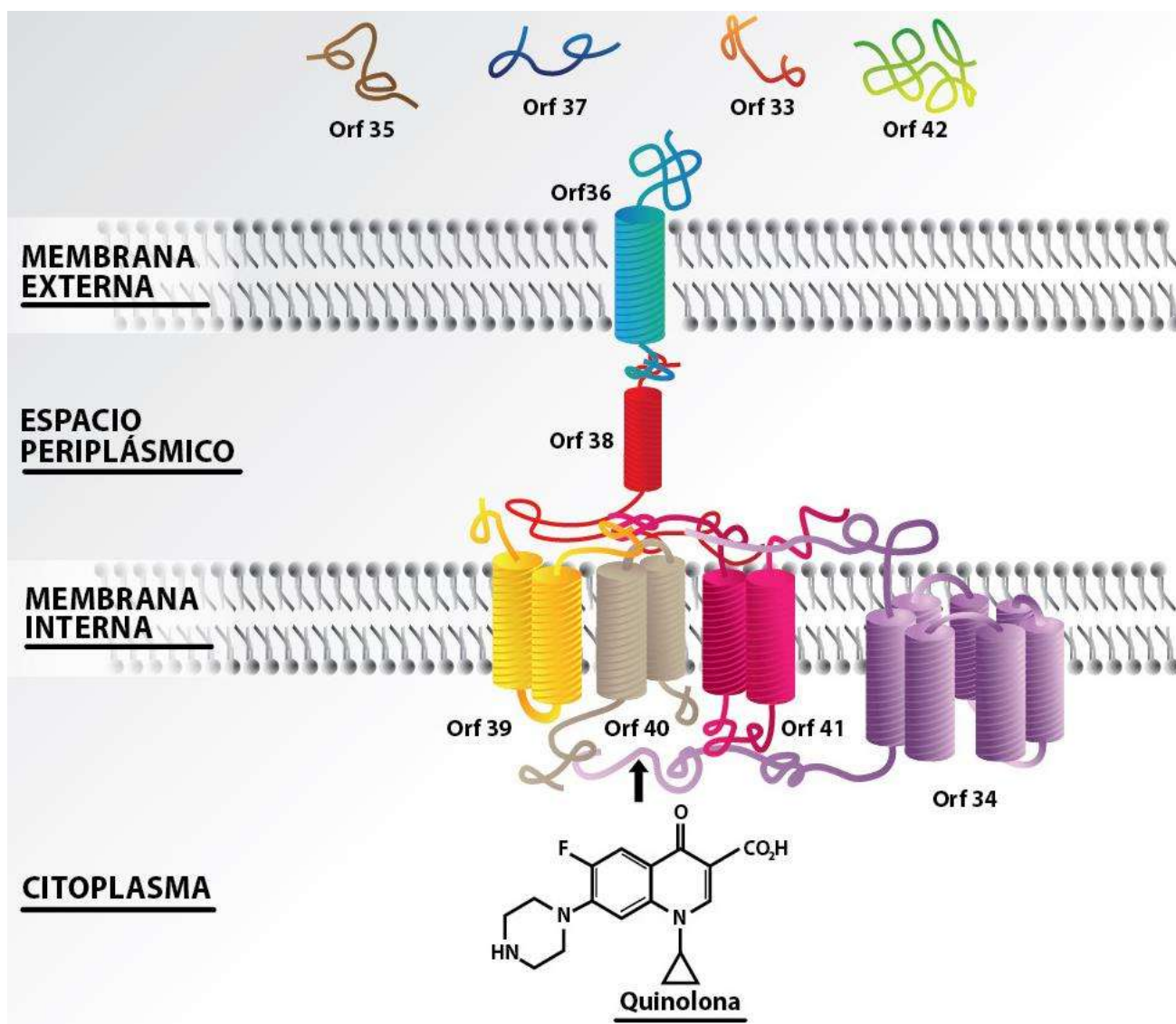


Figura 25. Modelo que sugiere la localización de las proteínas codificado por los *orfs* del operón *OPcr*. Se muestra la proteína de membrana externa codificada por el *orf* 36 (en azul), una proteína de localización periplásmica codificada por el *orf* 38 (en rojo). En la membrana interna se localizan las proteínas codificadas por los *orfs* 39, 40 y 41 (en amarillo, gris y fucsia respectivamente) así mismo una ATPasa codificada por el *orf* 34 (en lila). Los barriles corresponden a los segmentos transmembranales de cada proteína predicha codificada por el operón. En la parte superior se señalan las proteínas de secreción codificadas por el *orf* 33 en (naranja), el *orf* 35 (en café), el *orf* 37 (en azul), y el *orf* 42 (en verde).

8.5 Síntesis de un RNA mensajero policistrónico codificado por los *orfs* del operón OPcr

El análisis *in silico* predice que los *orfs* 33 a 42 forman un operón denominado OPcr. Dado a que se ha reportado ampliamente que los genes que forman parte de un operón son transcritos en un ARNm policistrónico, se realizó el análisis mediante RT-PCR de las regiones intergénicas entre los *orfs* 33 al 42 (**Figura 26**) que forman parte del operón predicho. Para lo cual se diseñaron parejas de oligonucleótidos específicas que permitiera amplificar las regiones intergénicas entre los *orfs*, los tamaños de los amplificados varían entre 285 y 454 pares de bases.

Se obtuvieron amplificados correspondientes a las regiones intergénicas que incluyen desde el *orf* 34 al *orf* 42, sin embargo, no se logró la amplificación de la banda de transcrito correspondiente a la región intergénica entre los *orfs* 33-34, ni en la región de los *orfs* 42-43, indicando que el *orf* 33 y el *orf* 43 no forman parte del operón (**Figura 27**). Este resultado demostró que los *orfs* 35, 36 y 37 forman parte de un operón que se extiende desde el *orf* 34 al *orf* 42.

8.6 Amplificación y clonación del operón OPcr

Debido a que se identificó el operón OPcr en el plásmido pUM505, que podría estar formando un sistema de resistencia a quinolonas y de virulencia, el operón OPcr se clonó y posteriormente se transfirió a la cepa de *E. coli* JM101.

Para realizar la clonación primeramente se realizó la amplificación del operón OPcr mediante PCR y obteniendo un fragmento de aproximadamente 9218 pb el cual fue ligado en el vector de recuperación de fragmentos de PCR pJET 1.2/blunt obteniendo un plásmido recombinante de 12,192 pb que se transfirió a la cepa *E. coli* JM101 mediante transformación. Con la finalidad de verificar la correcta ligación del operón en el vector se realizaron PCR's de los *orfs* individuales del operón (**Figura 28**).

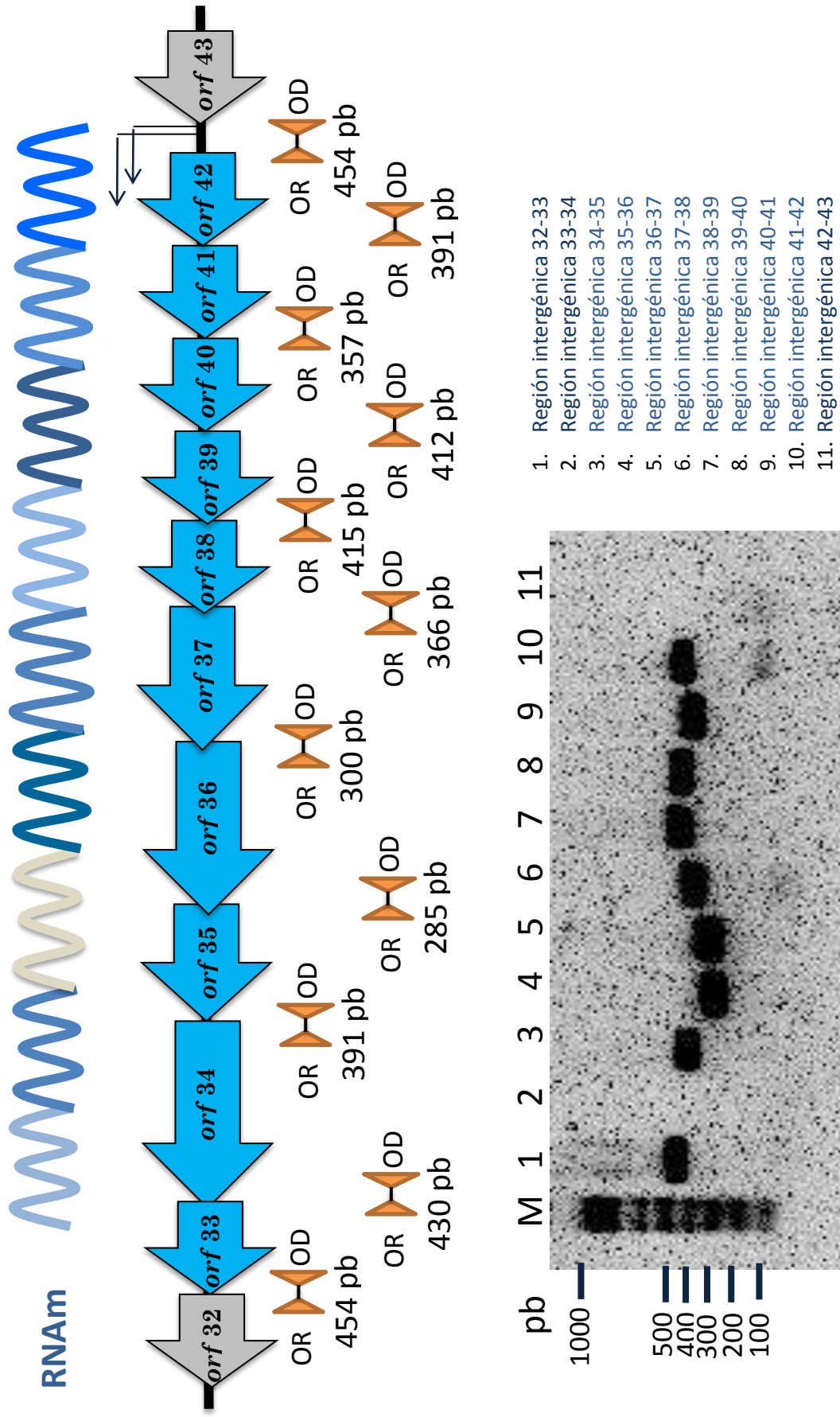


Figura 26. Determinación de la síntesis de RNAm policistrónico por RT-PCR. Se muestra un RNA mensajero policistrónico producto de la transcripción de los orfs del operón predicho que incluye a los orfs del 33 al 42 y se representan con flechas azules. Las flechas en gris corresponden a los orfs aledaños al operón. Con las flechas naranjas se indican los oligonucleótidos diseñados y el tamaño del amplificado en pares de bases correspondiente a cada una de las regiones intergénicas. En el gel de agarosa se muestran los amplificados de las regiones intergénicas del operón predicho. El carril M corresponde al marcador de tamaño y los carriles del 1 al 11 muestran las bandas de amplificación de las regiones intergénicas.

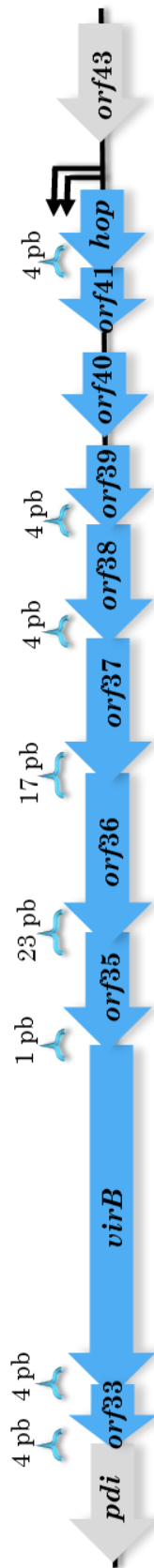


Figura 27. Arreglo genómico del operón de la isla de patogenicidad de pUM505. El operón incluye a los *orf*s desde el 34 al 42, codificados por la cadena complementaria del ADN, los cuales se muestran en fechas de color azul, se indica en corchetes los pares de bases por medio de las cuales se traslapan los *orf*s, y rio arriba del *orf* 42 (*hop*) se señalan en flechas negras dos probables promotores.

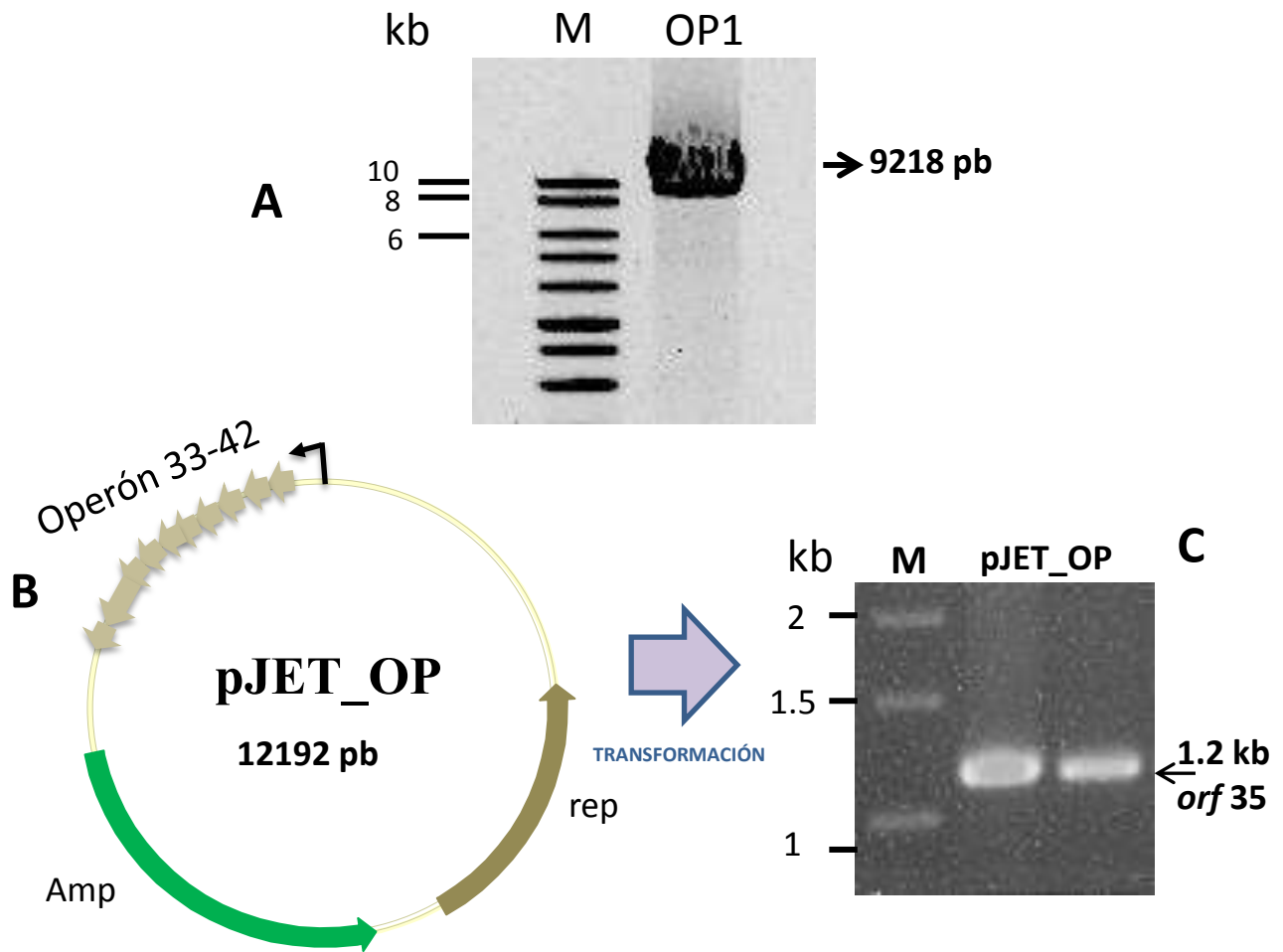


Figura 28. Clonación del operón OPcr de pUM505 en el vector pJET 1.2/blunt. A. Gel de agarosa donde se muestra el producto de PCR del operón, donde se observa el marcador de tamaño, M y una banda de amplificación de 9218 pb. **B.** Mapa genético del plásmido recombinante obtenido pJET_OP de 12192 pb. **C.** Gel de agarosa representativo de la caracterización del operón, donde se muestran dos bandas de amplificación de 1.2 kb correspondientes al tamaño del *orf 35* de dos de las transformantes obtenidas.

8.7 Amplificación y clonación de los *orfs* individuales del operón OPcr

Se realizó la amplificación mediante PCR de los *orfs* 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 y 42 del operón y se realizó la ligación en el vector de recuperación de fragmentos de PCR pJET 1.2/blunt. Se obtuvieron sus respectivos plásmidos recombinantes y se transfirieron a la cepa *E. coli* JM101 mediante transformación. Para caracterizar las transformantes obtenidas se realizaron PCR's de cada uno de los *orfs* y para comprobar la presencia del *orf* de interés se realizó una electroforesis, las condiciones empleadas se describen en el apartado de materiales y métodos.

8.8 Curvas de susceptibilidad a quinolonas

Para comprobar si el operón OPcr está relacionado con el fenotipo de susceptibilidad a quinolonas, se realizaron curvas de susceptibilidad a quinolonas representativas de cada una de las generaciones de desarrollo de estos antibióticos. El ácido nalidíxico representa a la primera generación, ciprofloxacina y norfloxacina a la segunda, mientras que levofloxacina a la tercera generación y por último moxifloxacina, quinolona de cuarta generación. Se utilizó como control la cepa *E.coli* JM101 sin el operón clonado y la cepa *E.coli* JM101 que posee el plásmido recombinante pJET_OPcr.

En todas las pruebas de susceptibilidad realizadas se observó un mayor crecimiento de la cepa de *E. coli* JM101 que posee el operón OPcr, lo que refleja un incremento en la resistencia, en comparación de la cepa JM101 donde no está presente el operón (**Figuras 29, 30, 31, 32 y 33**). Por consiguiente, estos resultados mostraron que el operón OPcr confiere resistencia a quinolonas.

8.9 Ensayos de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC's)

Dado que el operón OPcr está constituido de múltiples genes de los cuales se tenían antecedentes de que los *orfs* 35, 36 y 37 en conjunto conferían resistencia a quinolonas como ciprofloxacina y levofloxacina, para evaluar la participación de individual de cada uno de los genes del operón OPcr en la resistencia a quinolonas, se realizaron ensayos para determinar la concentración mínima

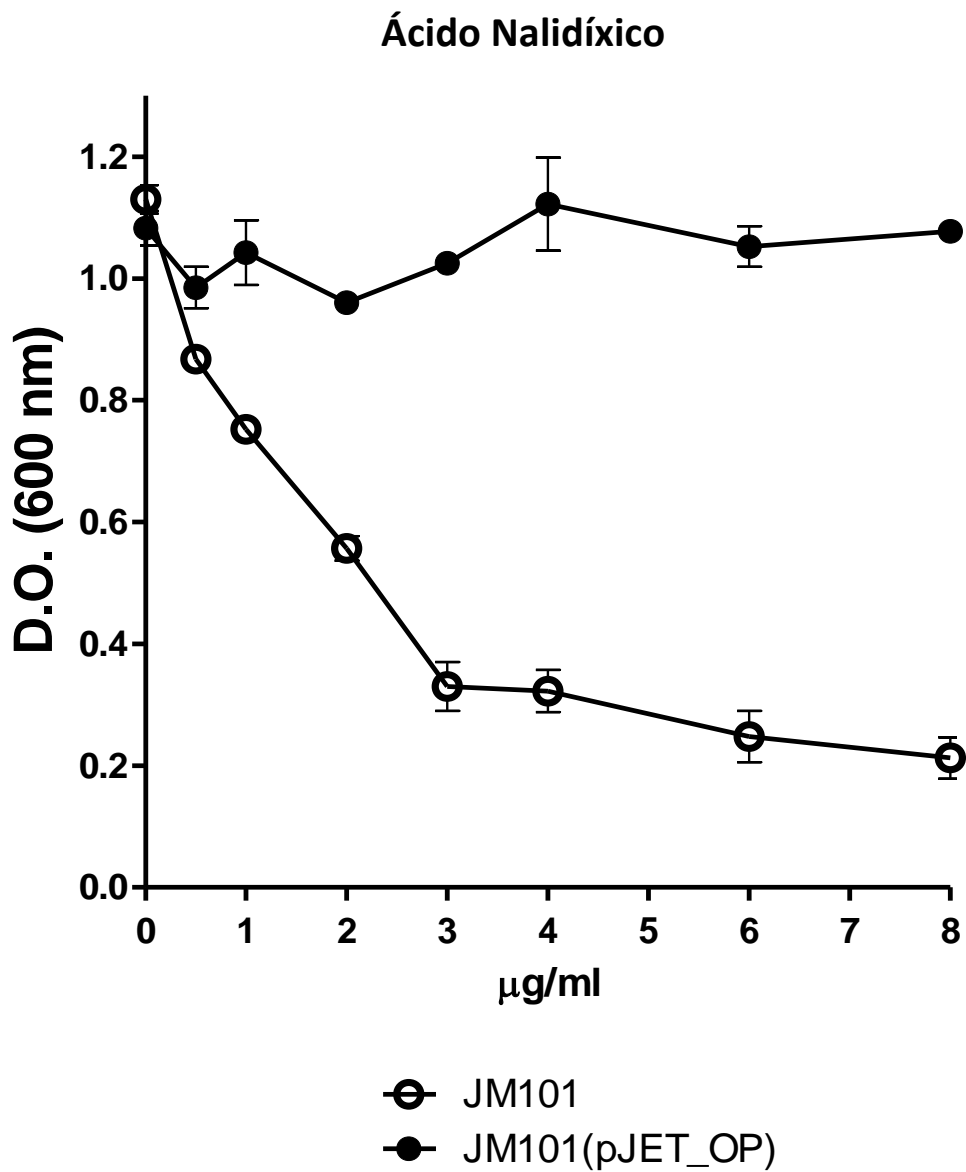


Figura 29. Susceptibilidad a ácido nalidíxico del operón OPcr de pUM505. Los cultivos se crecieron en CN por 18 horas a 37°C con agitación constante a las diferentes concentraciones del antibiótico indicadas y se midió la absorbancia a 600nm. *E.coli* JM101 (○), *E.coli* JM101 pJET_OP (●). Se muestran las bandas de error estándar de la media, n=6.

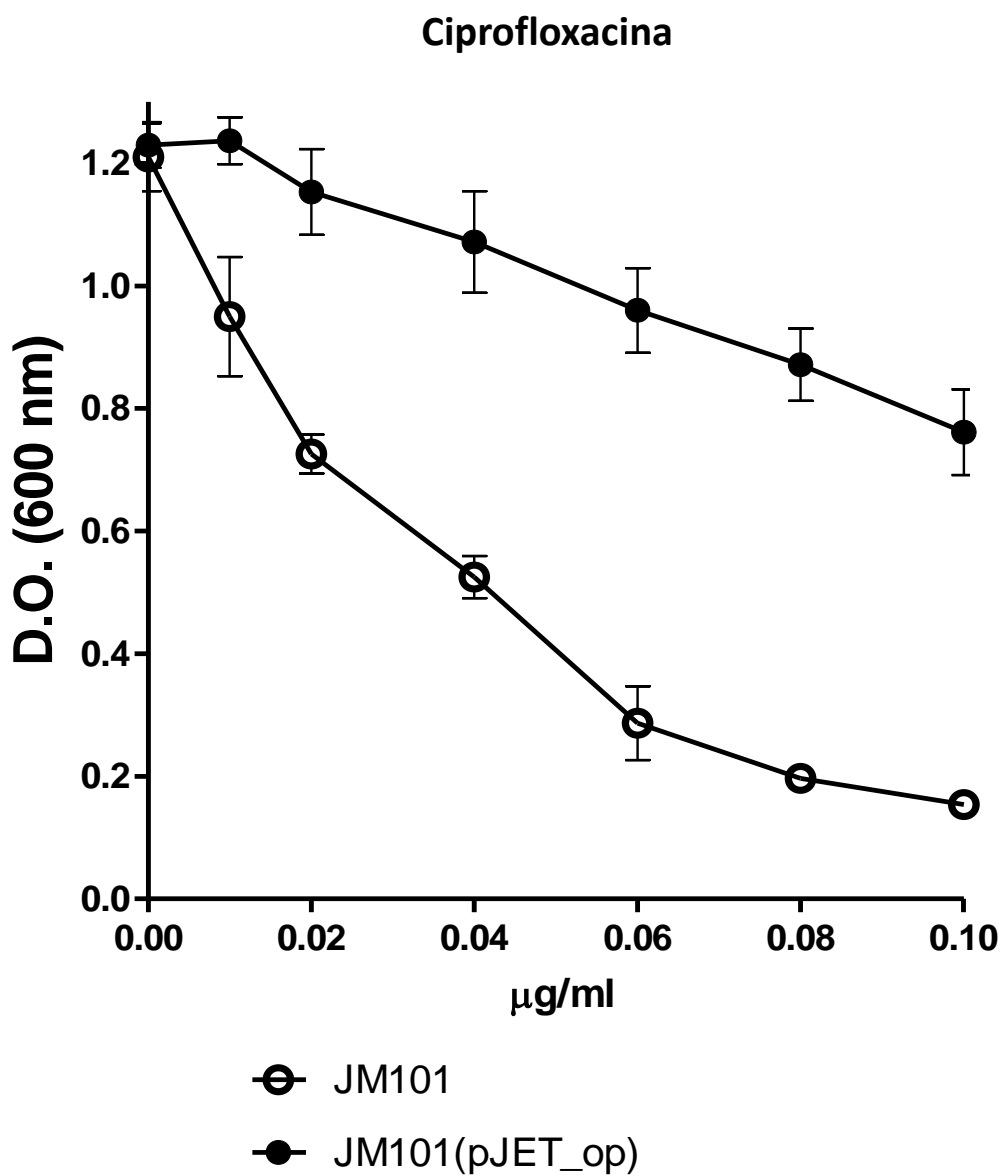


Figura 30. Susceptibilidad a ciprofloxacina del operón OPcr de pUM505. Los cultivos se crecieron en CN por 18 horas a 37°C con agitación constante a las diferentes concentraciones del antibiótico indicadas y se midió la absorbancia a 600nm. *E.coli* JM101 (○), *E.coli* JM101 pJET_OP (●). Se muestran las bandas de error estándar de la media, n=6.

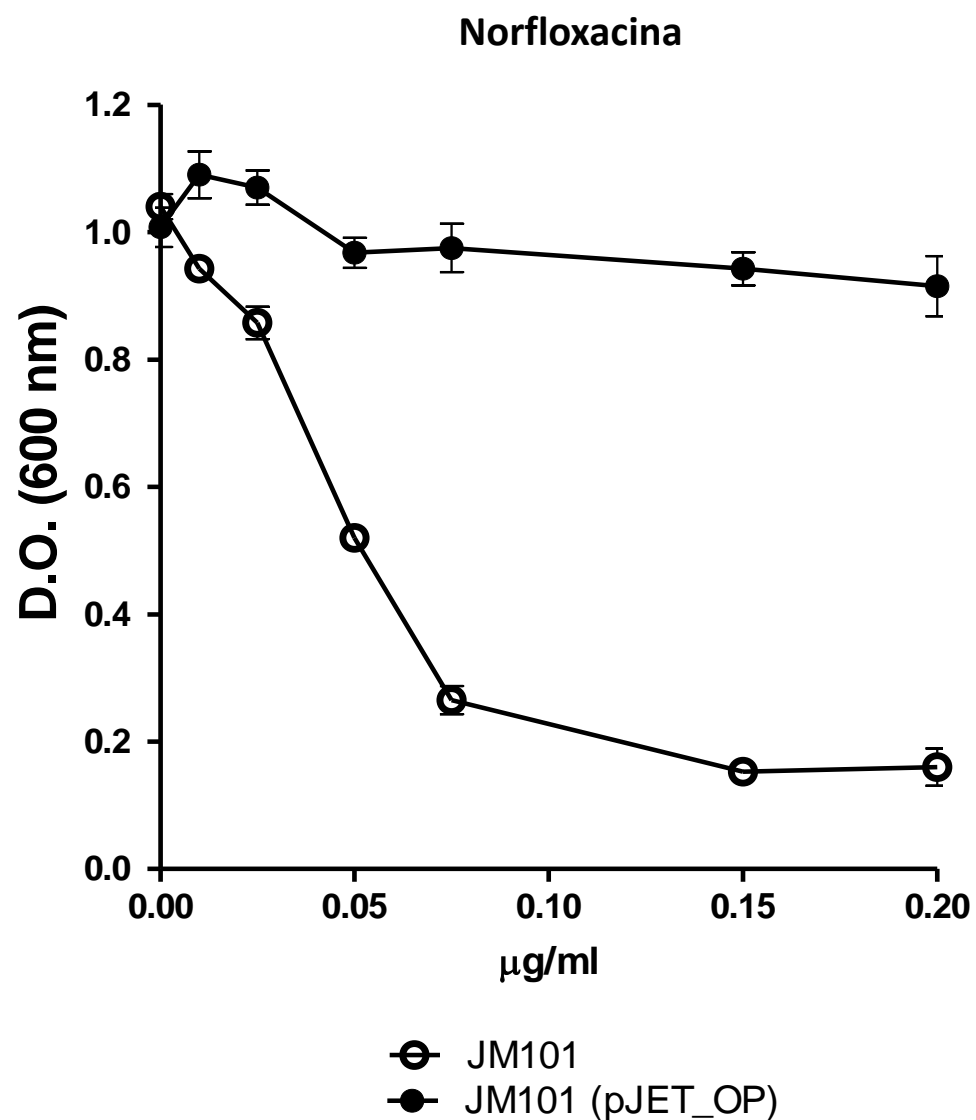


Figura 31. Susceptibilidad a norfloxacin del operón OPcr de pUM505. Los cultivos se crecieron en CN por 18 horas a 37°C con agitación constante a las diferentes concentraciones del antibiótico indicadas y se midió la absorbancia a 600nm. *E.coli* JM101 (○), *E.coli* JM101 pJET_OP (●). Se muestran las bandas de error estándar de la media, n=6.

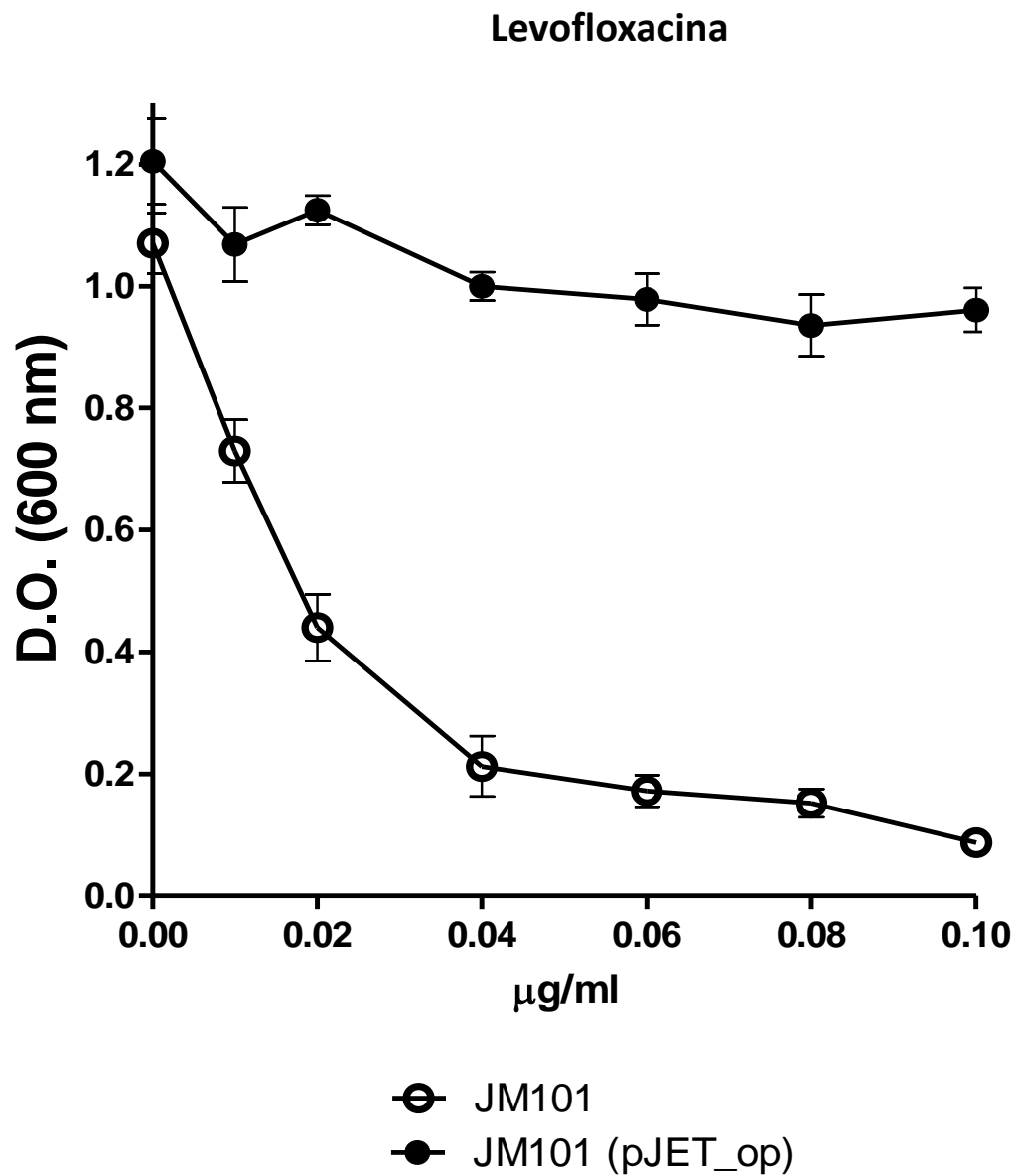


Figura 32. Susceptibilidad a levofloxacin del operón de pUM505. Los cultivos se crecieron en CN por 18 horas a 37°C con agitación constante a las diferentes concentraciones del antibiótico indicadas y se midió la absorbancia a 600nm. *E.coli* JM101 (○), *E.coli* JM101 pJET_OP (●). Se muestran las bandas de error estándar de la media, n=6.

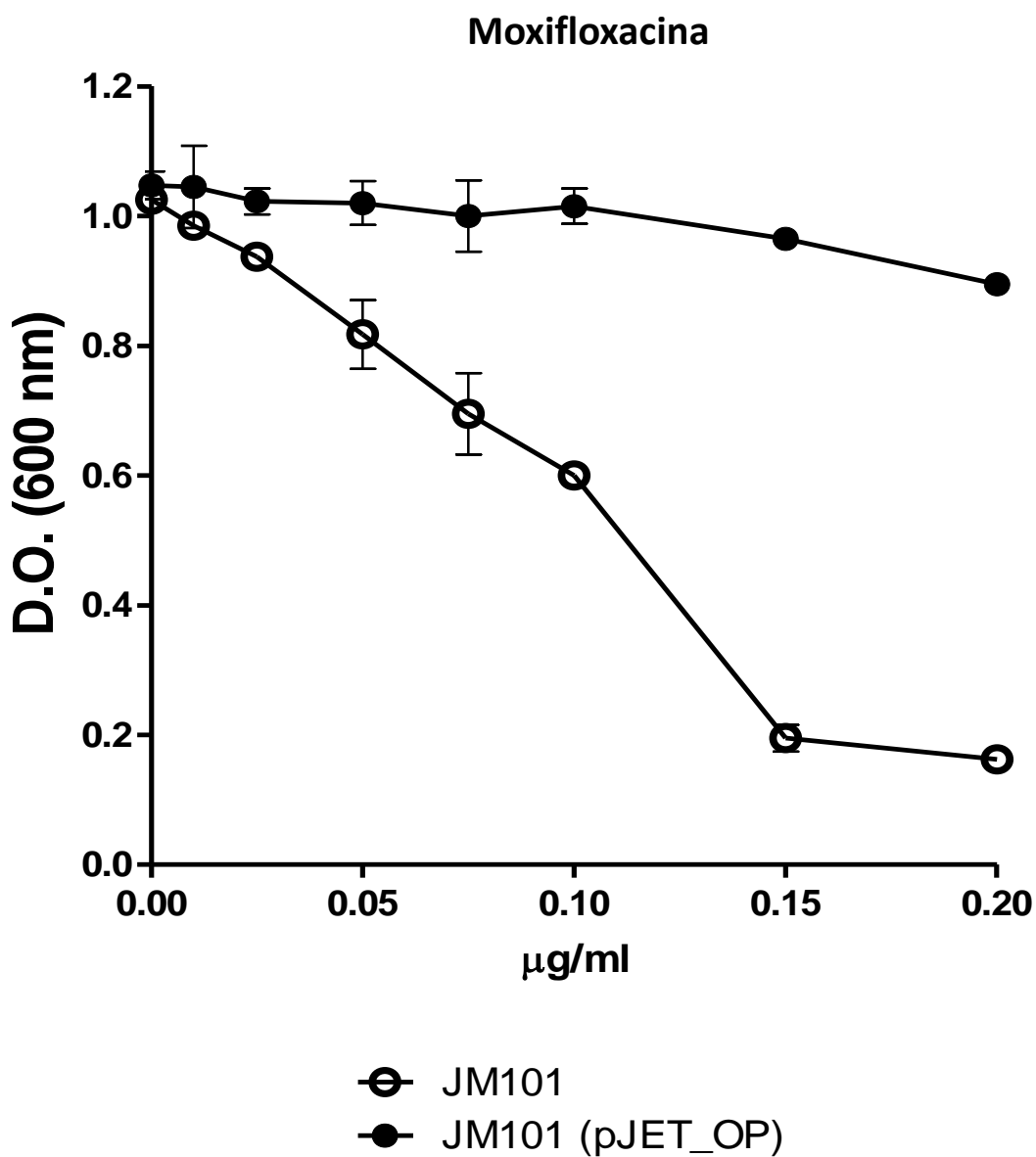


Figura 33. Susceptibilidad a moxifloxacina del operón OPcr de pUM505. Los cultivos se crecieron en CN por 18 horas a 37°C con agitación constante a las diferentes concentraciones del antibiótico indicadas y se midió la absorbancia a 600nm. *E.coli* JM101 (○), *E.coli* JM101 pJET_OP (●). Se muestran las bandas de error estándar de la media, n=6.

inhibitoria (MIC) a las quinolonas de la cepas de *E. coli* con los genes del operón **Tabla 8**. En los ensayos MIC se utilizó como control a la cepa de referencia *E. coli* ATCC, determinando que los resultados del MIC para cada una de las quinolonas se encuentran dentro de los valores establecidos, lo que le da validez a dicho ensayo. También se trabajó con la cepa *E.coli* JM101 como control negativo de la resistencia.

La clonación independiente de los *orfs* 35, 40 y 41 tuvo como consecuencia un incremento en los valores de MIC para todas las quinolonas, de igual manera se observó que los *orfs* 35, 36 y 37 clonados en conjunto incrementaron el MIC de la cepa de *E. coli* JM101. El *orf* 36 mostró que a excepción de la ciprofloxacina aumento en el nivel de resistencia para el resto de las quinolonas, mientras que el *orf* 37 también a aumenta los valores de MIC de la mayoría de las quinolonas, solamente el MIC para norfloxacina no fue modificado. El *orf* 39 solo mostró resistencia para moxifloxacina y por último, los *orfs* 38 y 42, mostraron no estar participando en la resistencia a quinolonas.

8.10 Ensayos de virulencia

Debido a que el operón OPcr posee el gen *Hop*, que previamente fue relacionado con el aumento de la virulencia, se procedió a determinar la participación del operón OPcr en la virulencia, así como de algunos de sus genes. Los ensayos de virulencia se realizaron utilizando como modelo de infección el invertebrado *C. elegans*, con la finalidad de evaluar el porcentaje de sobrevivencia de estos nemátodos al ponerlos en contacto con la cepa *E. coli* JM101 (pJET_OPcr) a diferentes horas. Se utilizaron como control negativo la cepa *E. coli* JM101 y el medio mínimo sin inoculación bacteriana. Se obtuvo como resultado, que la presencia del operón OPcr aumenta la virulencia de la bacteria, al observar la disminución en la sobrevivencia del nemátodo en aproximadamente un 30%, en comparación con el control (medio mínimo) y la cepa sin el operón (**Figura 34**). Estos resultados demuestran la participación del operón OPcr en la virulencia.

Tabla 8. Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) a quinolonas de los orfs del operón OPcr.

Cepas	CMI ($\mu\text{g/ml}$) Quinolonas				
	CPX	LVX	NOR	MXF	NAL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.015	0.031	0.062	0.015	2
<i>E. coli</i> JM101	0.015	0.031	0.062	0.031	4
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_ <i>orf</i> 35)	0.062	0.125	0.25	0.062	8
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_ <i>orf</i> 36)	0.015	0.125	0.125	0.031	8
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_ <i>orf</i> 37)	0.125	0.062	0.062	0.062	8
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_ <i>orfs</i> 35-37)	0.125	0.125	0.125	0.062	8
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_ <i>orf</i> 38)	0.008	0.031	0.062	0.015	4
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_ <i>orf</i> 39)	0.008	0.031	0.062	0.062	4
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_ <i>orf</i> 40)	0.031	0.062	0.125	0.062	4
<i>E. coli</i> JM101 (pJET_ <i>orf</i> 41)	0.125	0.062	0.125	0.125	8
<i>E. coli</i> J53-3 (pUC_ <i>orf</i> 42)	0.015	0.062	0.062	0.031	2

Así mismo, se evaluó la participación individual de los *orfs* del operón en la virulencia y se observó que los *orfs* 36, 38, 39, 40 y 41 no participan en la virulencia puesto que el porcentaje de sobrevivencia es similar al obtenido para los controles negativos. Además, se observó la disminución en el porcentaje de sobrevivencia de un 25 a un 35% por la presencia de los *orfs* 35, 37, 42 y por la transferencia de los *orfs* 35, 36 y 37 clonados en conjunto (**Figura 35**), lo que demuestra la participación diferencial de los *orfs* del operón OPcr en la virulencia.

Puesto que los análisis *in silico* predicen que los *orfs* 35, 37 y 42 codifican a probables proteínas que son secretadas, se realizó un nuevo ensayo de virulencia en *C. elegans*, empleando los sobrenadantes de los cultivos bacterianos de las cepas bacterianas que contienen estos *orfs* clonados, lo cual resultó en una disminución de aproximadamente un 30 a un 55% del porcentaje de sobrevivencia en *C. elegans* por la presencia de los sobrenadantes (**Figura 36**).

Con la finalidad de identificar si el producto codificado por los *orfs* 35, 37 y 42 que incrementa la virulencia es de origen proteico, se emplearon los sobrenadantes de las cepas bacterianas que mostraron virulencia (*orfs* 35, 37, 42 y 35-37), los cuales fueron tratados previamente con pronasa a una concentración de 10mg/mL, la cual es una mezcla comercial de proteasas aisladas de *Streptomyces griseus* que realiza una digestión completa o casi completa en los aminoácidos individuales. Además, los sobrenadantes de las cepas bacterianas seleccionadas (con los *orfs* 35, 37, 42 y 35-37 clonados) se sometieron a desnaturalización por calentamiento a 95°C durante dos horas, con la finalidad de desnaturalizar las probables proteínas y así desorganizar su estructura tridimensional y por consiguiente generar la pérdida de su función, posteriormente el ensayo de virulencia se realizó igual a los anteriores. Los resultados mostraron que los sobrenadantes de las cepas de *E. coli* JM101 con los *orfs* 35, 37 y 42 no disminuyeron el porcentaje de sobrevivencia de los nemátodos, su comportamiento es similar al de los controles (medio M9 y la cepa bacteriana sin los *orfs*) (**Figuras 37 y 38**). Estos datos indican que las proteínas que son secretadas por el operón OPcr participan en la virulencia de la bacteria, sugiriendo

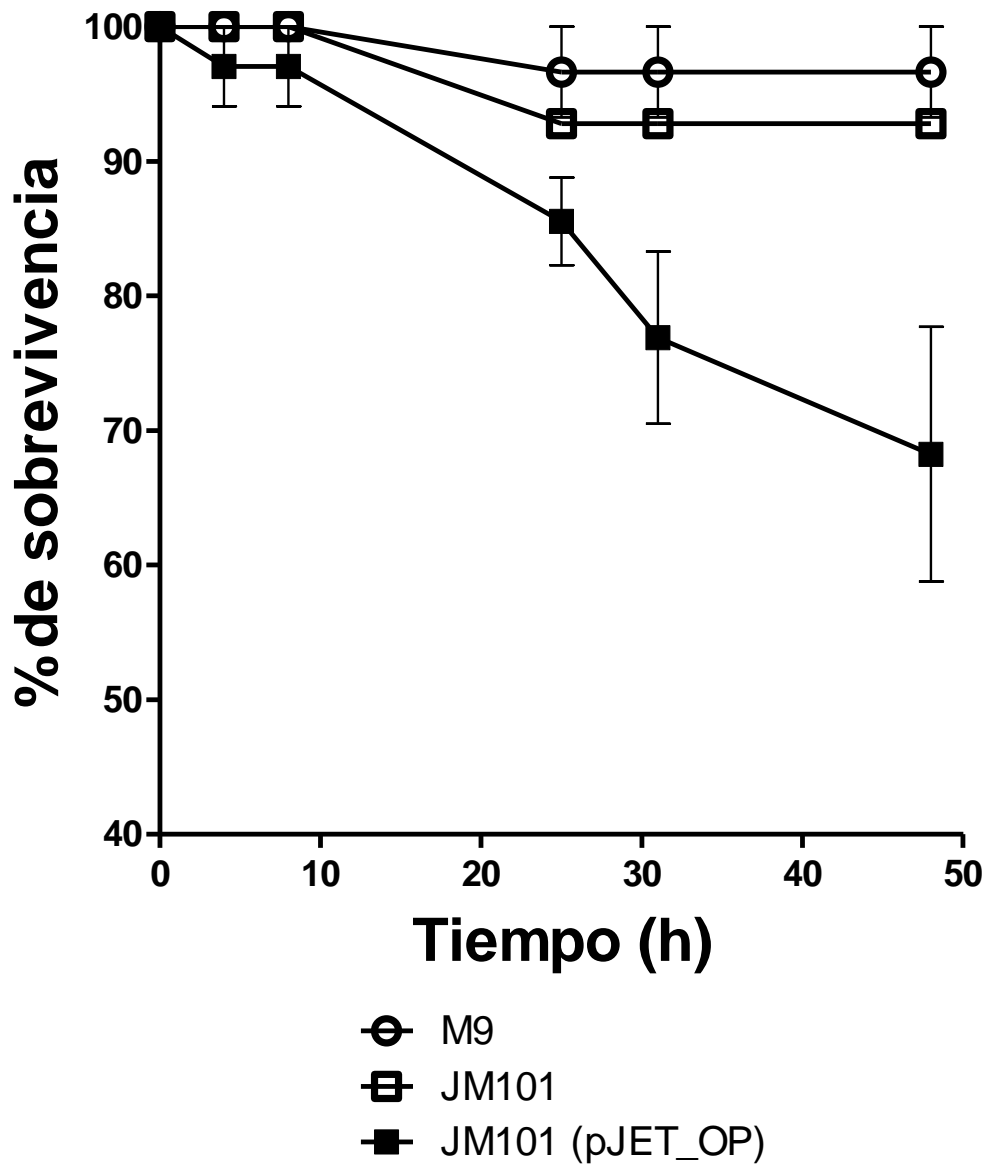


Figura 34. Virulencia conferida por el operón OPcr de pUM505 en *C. elegans*. Medio M9 utilizado como control negativo (o), *E. coli* JM101 (□) y *E. coli* JM101 (pJET_OP) (▪). Se muestran barras de error estándar de la media, n=6.

que el OPcr además de conferir resistencia a quinolonas, puede codificar a un sistema de expulsión de factores de virulencia.

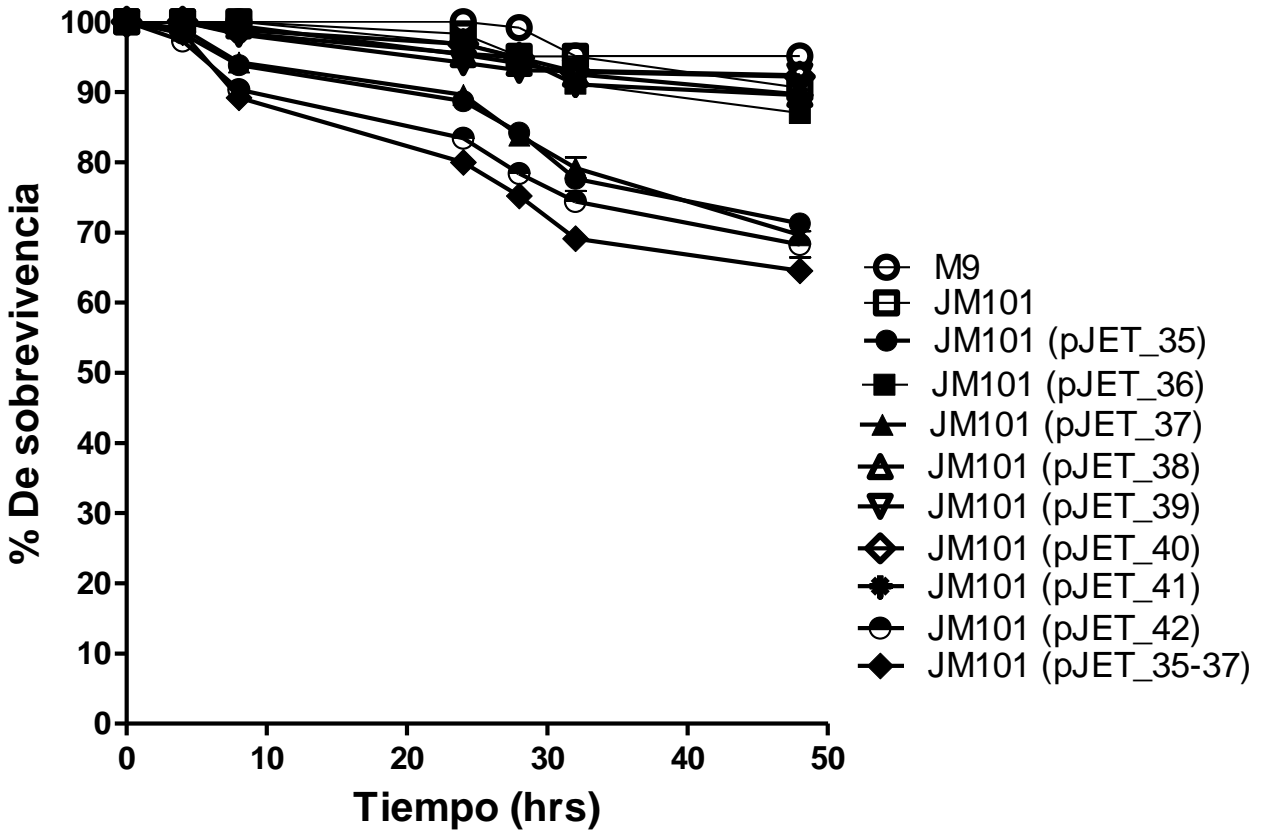


Figura 35. Virulencia conferida por los cultivos bacterianos de los *orfs* individuales del operón OPcr de pUM505 en *C. elegans*. Medio M9 (o) utilizado como control negativo, *E. coli* JM101 (□) y *E. coli* JM101 (pJET_*orfs*). Se muestran barras de error estándar de la media, n=6.

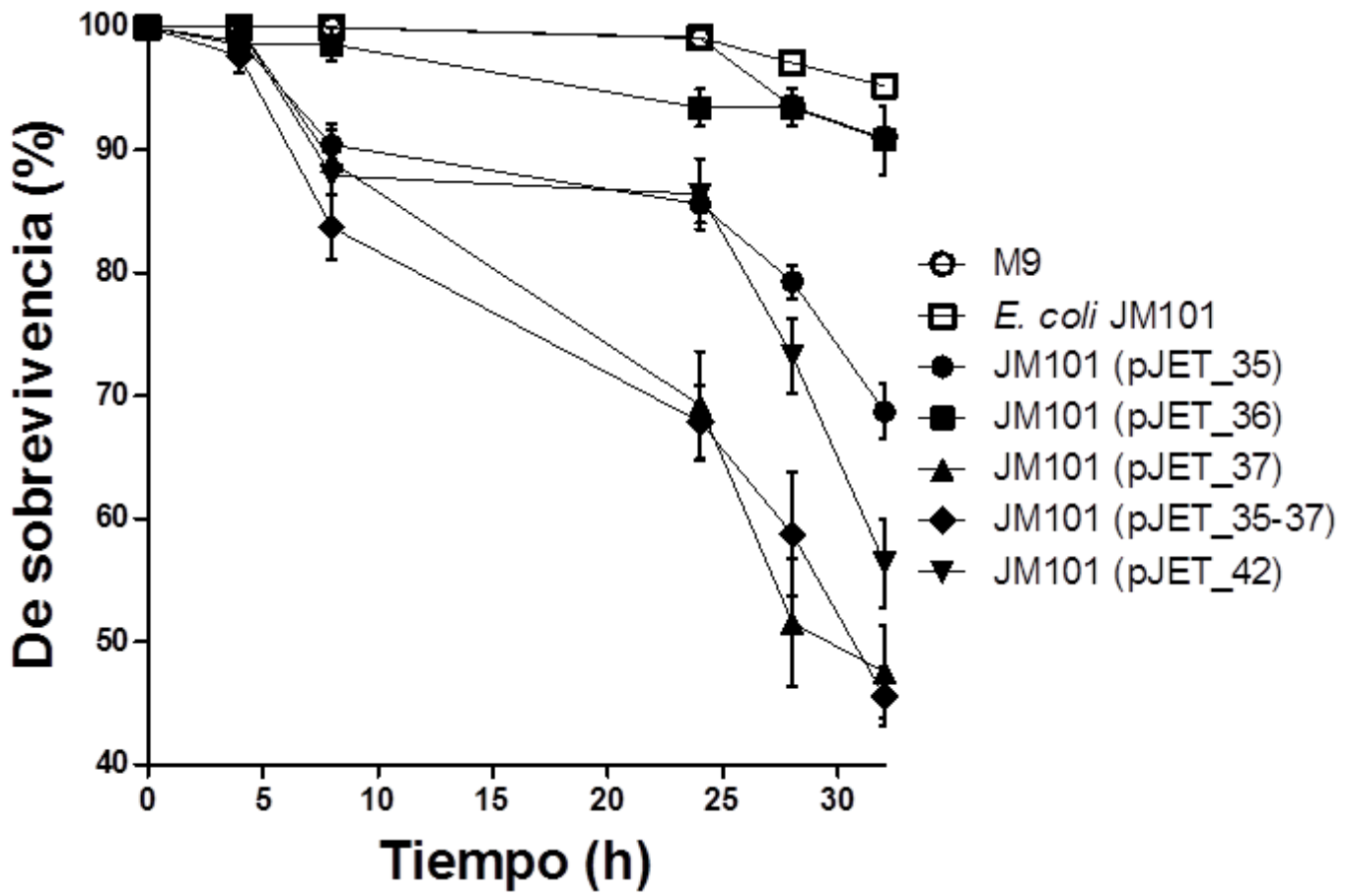


Figura 36. Virulencia conferida por los sobrenadantes de los *orfs* individuales del operón OPcr de pUM505 en *C. elegans*. Medio M9 (o) utilizado como control negativo, *E. coli* JM101 (□) y *E. coli* JM101 (pJET_*orfs*). Se muestran barras de error estándar de la media, n=6.

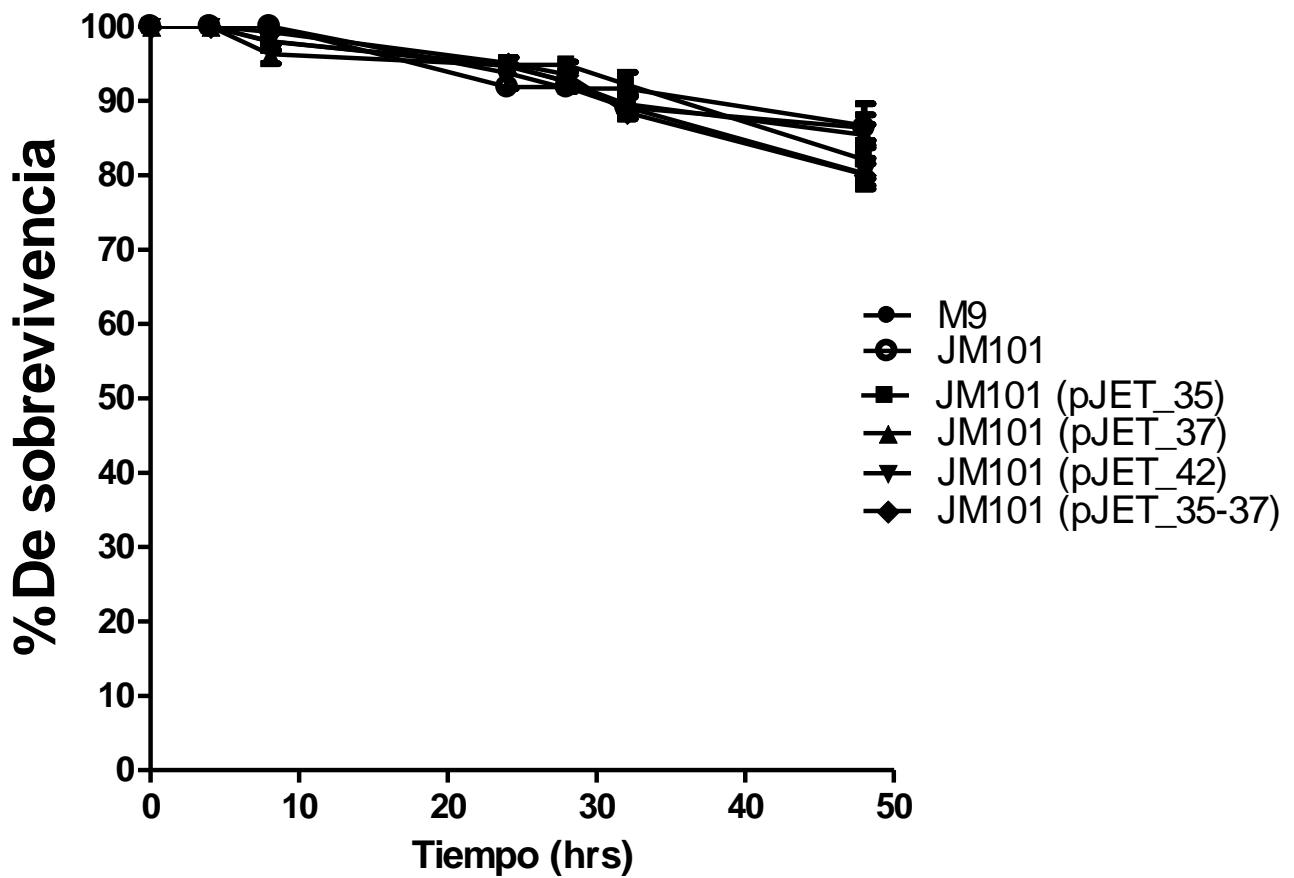


Figura 37. Efecto en la virulencia de la adición de proteasas en los sobrenadantes de las proteínas de secreción del operón OPcr en *C. elegans*. Medio M9 utilizado como control negativo (o), *E. coli* JM101 (□) y *E. coli* JM101 (pJET_orfs). Se muestran barras de error estándar de la media, n=6.

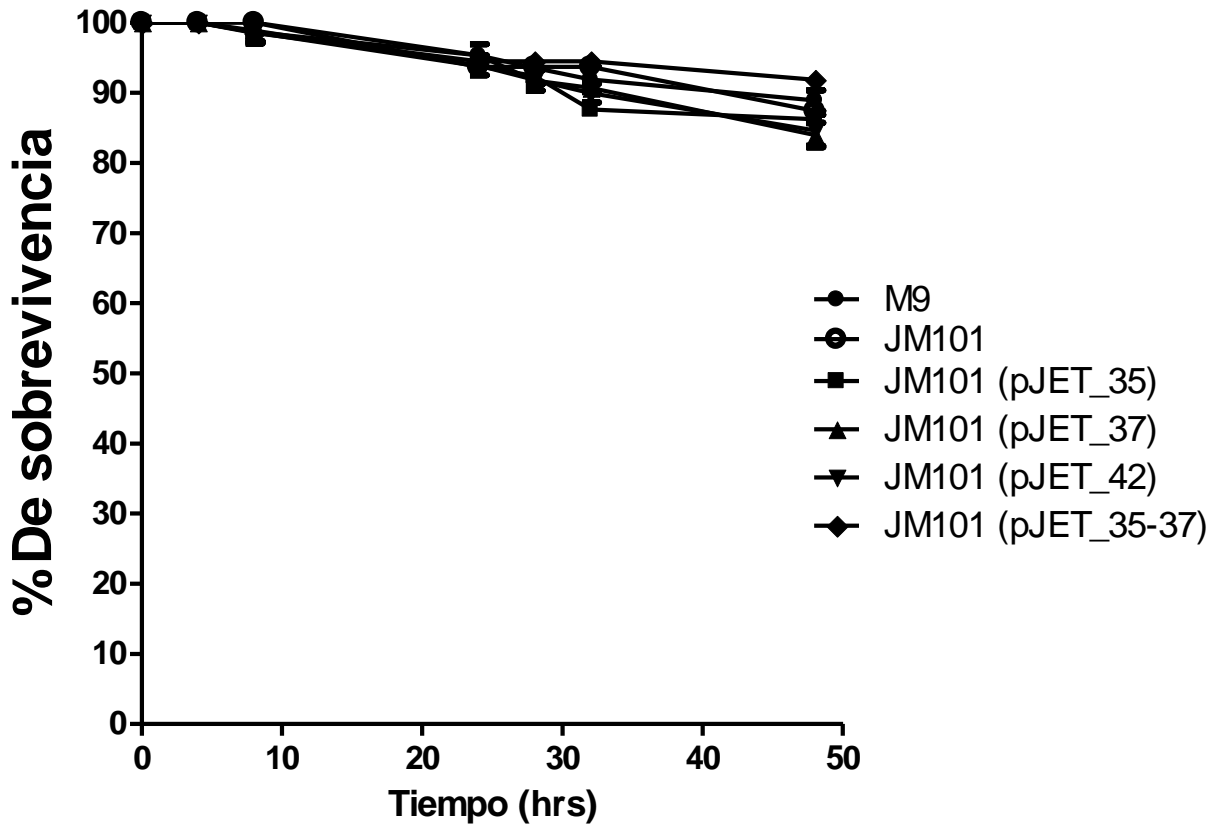


Figura 38. Efecto en la virulencia del uso de calor (95°C) en los sobrenadantes de las proteínas de secreción del operón OPcr en *C. elegans*. Medio M9 utilizado como control negativo (o), *E.coli JM101* (□) y *E.coli JM101* (pJET_OP) (▪). Se muestran barras de error estándar de la media, n=6.

9. DISCUSIÓN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa ampliamente distribuida en el ambiente, incluyendo suelo y agua, así como en asociación con varios organismos vivos y es fuente de infecciones oportunistas en humanos (Ochoa y col., 2013). Recientemente, la Organización Mundial de la Salud clasificó a *P. aeruginosa* como uno de los patógenos prioritarios contra los que es necesario, urgentemente, desarrollar nuevos antibióticos, puesto que se ha estimado que las infecciones causadas por bacterias resistentes podrían causar la muerte de más de 10 millones de personas en el año 2050. Esta bacteria posee múltiples factores de virulencia implicados en la infección aguda y daño de la célula huésped, además de que es capaz de adquirir genes que pueden contribuir en la resistencia e incrementar la virulencia, a través de la transferencia horizontal de genes, mediada por elementos genéticos móviles (EGM) como plásmidos.

El plásmido pUM505 fue aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de un paciente hospitalizado en la ciudad de Morelia, Michoacán. El plásmido pUM505 posee una isla de patogenicidad (PAI) de 67 kb y 78 marcos de lectura abiertos (*orfs* 1-51 y 112-138), presenta una estructura tipo mosaico que consta de tres bloques, los cuales están relacionados en secuencia y organización genética con grupos de genes en la isla PAPI-1 de *P. aeruginosa* PA14, un aislado clínico altamente virulento (He et al., 2004), debido a la homología de esta región con PA14 y a que están presentes genes que codifican a integrasas y factores relacionados a sistemas de conjugación se nombró como isla de patogenicidad de pUM505 (Ramírez y col, 2011).

La transferencia del plásmido pUM505 a una cepa de *P. aeruginosa* PAO1, demostró su participación en virulencia, al realizarse un ensayo utilizando modelo de infección la hoja de lechuga cuyos resultados mostraron que cuando se inoculó PAO1 (pUM505), ésta produjo una lesión mayor que la cepa PAO1 sin el plásmido, adicionalmente, se determinó que la cantidad de UFC de las lesiones,

incrementó cuatro veces más en el caso de la cepa PAO1 (pUM505) respecto a la cepa PAO1 sin el plásmido. La generación de una biblioteca de genes del plásmido pUM505 y su posterior caracterización, permitió determinar que los orfs 1, 2, 16, 17, 42, 97, 111, el gen traG, el gen tpnA del plásmido pUM505 son capaces de incrementar la virulencia de *E. coli* JM101 y de *P. aeruginosa* PAO1 (Rodríguez y col., 2016). Dado que el el *orf* 42 se predijo que codifica a una proteína tipo Hop, una proteína que en otros sistemas participa en la virulencia, se realizó su clonación individual, mostrando que la transferencia de este gen genera el incremento en la virulencia tanto para *E.coli* como para *P. aeruginosa* (Rodríguez y col., 2016).

Aunado a la participación de pUM505 en la virulencia bacteriana, mediante curvas de susceptibilidad se demostró que el plásmido confiere resistencia a las quinolonas ciprofloxacina y levofloxacina, con respecto a la cepa PAO1 que no tiene presente el plásmido, sugiriendo que pUM505 posee genes que confieren resistencia a quinolonas por un mecanismo aún no reportado pero en el que podrían participar los genes que codifican para proteínas hipotéticas. En nuestro grupo de trabajo se realizó la búsqueda de genes del plásmido pUM505 responsables de la resistencia a quinolonas y dado a que los mecanismos de resistencia más comunes y que se han reportado hasta a la fecha en *P. aeruginosa* son los sistemas membranales de expulsión se realizó la búsqueda de proteínas de membrana y de periplasma mediante análisis *in silico* de las proteínas hipotéticas codificadas en pUM505, se seleccionaron proteínas con tamaños mayores a 200 aminoácidos para incrementar la probabilidad de seleccionar proteínas de membrana ya que ha sido descrito que la mayoría de las proteínas que forman parte de sistemas de transporte tienen tamaños mayores a 200 aminoácidos. De manera inicial se seleccionaron a los *orfs* 35, 36 y 37, los cuales en conjunto confieren resistencia a las quinolonas ciprofloxacina y levofloxacina cuando son transferidos a la cepa de *E.coli* J53-2, pero al ser transferidos a *P. aeruginosa* PAO1 no se observó un aumento en la resistencia a ciprofloxacina lo que sugirió que la resistencia que ejercen los *orfs* 35, 36 y 37 no es suficiente para influir en la resistencia intrínseca a quinolonas de PAO1 (Rojas,

2012). Posteriormente, en el grupo de trabajo se identificó al *orf* 131 de pUM505, que codifica a la proteína CrpP y mediante una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) se determinó que esta proteína causa una modificación química a la molécula de ciprofloxacina, al transferirle un grupo fosfato, lo cual disminuye la actividad del antibiótico y en consecuencia origina la resistencia a la quinolona en la cepa *E. coli* J53-3, sin embargo, CrpP no confiere susceptibilidad a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (Chávez y col., 2018) por lo cual se continuó con la búsqueda de genes del plásmido pUM505 que pudieran estar involucrados en la resistencia a quinolonas en *P. aeruginosa*.

El genoma bacteriano comúnmente se encuentra organizado en operones (Osburn y Field, 2009) y dado a que el arreglo genómico de los *orfs* 35, 36 y 37 mostró que estos se encuentran traslapados por 23 y 17 pares de bases respectivamente, aunado al hecho de que se sugirió que estos tres *orfs* podrían estar formando un sistema de expulsión tripartita, el objetivo de este proyecto consistió en determinar si los *orfs* 35, 36 y 37 del plásmido pUM505 constituyen o forman parte de un operón. Un operón es un grupo de genes corregulados, coexpresados y con funciones relacionadas (Osburn y Field, 2009). Mediante análisis *in silico* en el programa FGENES, se identificó a un operón de 10 genes en la isla de patogenicidad del plásmido pUM505 que incluye a los *orfs* 33 al 42 y del que forman parte los *orfs* 35, 36 y 37. Una vez que se identificó a este operón, se procedió a buscar probables promotores río arriba del inicio del operón, correspondiente a la región 5' del *orf* 42. Haciendo uso del programa BPRM y el programa Virtual Footprint, se identificaron a dos probables promotores, un promotor σ^{70} y un promotor tipo σ^{Pvds} , que corresponden a promotores descritos en la expresión de genes de *P. aeruginosa*. El promotor Pvds ha sido encontrado que se requiere para la expresión de genes cuyos productos participan en virulencia, como es el caso de los genes *pvdA*, *pvdD*, *pvdE*, *ptxR*, *pvcA* que están involucrados en la síntesis y secreción de pioverdina. Las pioverdinas son sideróforos de alta afinidad, fluorescentes de color amarillo verdoso, son el principal sistema de adquisición de hierro en *Pseudomonas* y les dan a estos

organismos una ventaja competitiva en el medio ambiente. Además, las pioverdinas funcionan como moléculas de señalización extracelulares importantes para inducir la producción de factores de virulencia como la exotoxina A, la proteasa PrpL y la pioverdina misma, los cuales son principales contribuyentes a la capacidad que tiene esta bacteria de causar enfermedades (Lamont y col., 2002, Swingle y col., 2008).

El análisis *in silico* tipo BLAST permitió realizar la predicción de la probable función de las proteínas codificadas por los *orfs* del operón OPcr. Se encontró que las probables proteínas codificadas por los *orfs* 36 al 41 tienen identidad a proteínas involucradas en procesos de conjugación, la proteína VirB que es codificada por el *orf* 34 posee identidad con una ATPasa tipo VirB4, la proteína VirB4 codificada en el cromosoma de *P. aeruginosa* forma parte del sistema de secreción tipo IV, que está relacionado con la virulencia. El *orf* 35, codifica a una probable lipoproteína de transferencia conjugativa, asimismo se reportó que la proteína codificada por este *orf* tiene identidad del 95% a una lipoproteína de *P. aeruginosa* PA14 (Ramírez y col., 2011). En lo que respecta al *orf* 42, este codifica a una probable proteína Hop de secreción tipo III, en *P. syringae*, hop codifica a un efector el cual es inyectado en células vegetales por el sistema de secreción tipo III y produce daño a dichas células observándose lesiones en las hojas de la planta del tomate. La eliminación de *hop* reduce la formación de lesiones necróticas en las hojas del tomate (Linderberg y col., 2005), lo que sugiere que el *orf* 42 codifica a una proteína efectora tipo III la cual incrementa el daño. Todas estas probables proteínas codificadas con el operón presentan 100% de identidad a proteínas encontradas en *P. aeruginosa*.

El análisis de la estructura secundaria, probable localización y segmentos transmembrana de las proteínas codificadas por los *orfs* del operón permitió proponer que el operón OPcr codifica para un sistema de resistencia a quinolonas que además posee proteínas relacionadas con la virulencia y que algunas de estas proteínas son secretadas.

Hasta la fecha no se ha reportado ningún operón en plásmidos o en el cromosoma de *P. aeruginosa* que codifique un sistema de expulsión en el que se relacionen ambos fenómenos de resistencia y virulencia de forma tan estrecha y en el que sus unidades transcripcionales codifiquen a proteínas que sean, como tal, parte de la estructura del sistema de expulsión. A la fecha los reportes que se tienen es de dos operones, cuyos genes codifican a proteínas que regulan la función y expresión de otros genes o sistemas de expulsión, siendo estos últimos los que de manera directa si participan en generar ambos fenómenos, la resistencia y la virulencia. Por ejemplo, el operón *marRAB* (*mar*, resistencia a múltiples antibióticos), que es codificado en el cromosoma de cepas de *E. coli* y en bacterias entéricas (Barbosa y col., 2000), posee un tamaño de 1.1 kb, sin embargo, es su inducción la que da como resultado la expresión de factores de transcripción, como MarA, que controlan al menos 11 genes los cuales son los que dan lugar la salida de múltiples fármacos como quinolonas, tetraciclinas y beta lactámicos y (Sharma y col., 2017). El operón OmpR-EnvZ, identificado en la isla de patogenicidad de Salmonella, está implicado en la regulación de la resistencia y virulencia, que responde a condiciones ambientales, modificando la expresión de OmpC Y OmpF, porinas implicadas en la resistencia a antibióticos. Este sistema OmpR-EnvZ, regula a otro sistema codificado en la misma isla de patogenicidad, el operón SsrA-SsrB, que a su vez regula a un sistema de secreción tipo III necesario para la replicación de la bacteria y para la infección (Feng., y col 2003; Lee y col., 2001).

La resistencia a antibióticos y la virulencia guardan una relación muy estrecha entre sí, ya que cuando un microorganismo presenta resistencia a los antimicrobianos, esta le confiere la capacidad al patógeno de continuar replicándose en su huésped, y de expresar al máximo su carga genética de patogenicidad. El uso de los antibióticos ha dado lugar a la selección de bacterias resistentes lo que en un futuro puede ocasionar la muerte de miles de personas, incluso superando las muertes por cáncer, a este enorme problema de salud pública se suma la selección de cepas virulentas que poseen mayor capacidad de

colonización e infección, lo que le da posibilidad al microorganismo de ocasionar brotes infecciosos endémicos. Además, especialmente en el ambiente hospitalario, un patógeno debe ser no solo virulento sino también resistente a los antimicrobianos para poder causar una enfermedad infecciosa.

Para comprobar si efectivamente los *orfs* 35, 36 y 37 forman parte de un operón, tal como se predijo en los análisis *in silico* y dado a que una de las características de un operón es que los genes que lo conforman sean coexpresados, se determinó la formación de un RNAm policistrónico, debido al tamaño esperado del transcrito se realizó el análisis mediante RT-PCR de las regiones intergénicas entre los *orfs* 33 al 42 que forman parte del operón predicho. Se obtuvieron amplificadores correspondientes a las regiones intergénicas que incluyen desde el *orf* 34 al *orf* 42, pero en lo que respecta las regiones intergénicas de los *orfs* 33-34 y los *orfs* 42-43, no se encontraron bandas de amplificación. Este resultado demostró que los *orfs* 35, 36 y 37 si forman parte del operón OPcr el cual se extiende desde el *orf* 34 al *orf* 42.

Una vez que se identificó que el operón OPcr posee 9 genes, este se clonó y se transfirió a la cepa de *E. coli* JM101 para realizar ensayos de susceptibilidad a quinolonas y de virulencia. Esta cepa fue elegida considerando que no es virulenta y que se ha reportado que la concentración mínima inhibitoria a quinolonas, como ciprofloxacina, en cepas de *E. coli* es menor que la de cepas de *P. aeruginosa* (Hancock, 2005). La diferencia en la susceptibilidad de estas dos bacterias ha sido atribuida a la elevada resistencia natural o intrínseca de *P. aeruginosa*, dada por la alta permeabilidad de su membrana externa y al funcionamiento de proteínas membranales y periplásmicas que participan en la resistencia a quinolonas, por ejemplo los sistemas Mex (Wong y Kassen, 2011). Por lo tanto, el uso de la cepa de *E. coli* JM101 permite evaluar la función de un mecanismo de resistencia a antibióticos.

Los ensayos de susceptibilidad se realizaron para un grupo de quinolonas, en el que se incluyó a ácido nalidíxico, ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina y

moxifloxacin. Este grupo fue elegido a manera de incluir en los experimentos quinolonas representativas de cada una de las etapas de desarrollo de estos antibióticos, en vista de que a lo largo de cinco décadas, se realizaron grandes cambios en su estructura base, lo que en consecuencia modificó su espectro antimicrobiano, potencia y biodisponibilidad, haciendo que las quinolonas se consideren antibióticos eficaces y seguros para el tratamiento de infecciones bacterianas.

Los ensayos de susceptibilidad al grupo de las 5 quinolonas seleccionadas realizados, mostraron un mayor crecimiento cuando está presente el operón, lo que refleja un incremento en la resistencia, a comparación de la cepa donde no está presente el operón. Por consiguiente, estos resultados demostraron la participación del operón OPcr en la resistencia a quinolonas. Con la finalidad de evaluar la participación individual de los *orfs* del operón OPcr, cada uno de estos *orfs* fueron clonados y transferidos a la cepa de *E. coli* JM101, posteriormente, se realizaron ensayos de concentración mínima inhibitoria de las transformantes, lo que evidenció la participación de los *orfs* 35, 40 y 41 de manera individual y de los *orfs* 35, 36, 37 en conjunto, genes que incrementaron la resistencia para todo el grupo de quinolonas utilizadas. El *orf* 36 por su parte mostró tener un aumento en el nivel de resistencia para la mayoría de las quinolonas, la excepción fue para ciprofloxacina, mientras que para el *orf* 37 la excepción ocurrió para norfloxacina. El *orf* 39 solo mostró resistencia para moxifloxacin y por último, los *orfs* 38 y 42, demostraron no estar participando en la resistencia a quinolonas.

Estos datos nos permiten determinar que las proteínas codificada por el operón OPcr participan de forma diferencial en la resistencia a quinolonas, así mismo, se determinó que estos *orfs* no solo son capaces de conferir resistencia a ciprofloxacina y levofloxacina, como se mostró en los antecedentes, sino que son capaces de conferir resistencia a un grupo más extenso de quinolonas.

A fin de caracterizar el operón en cuanto a virulencia se realizaron ensayos con *C. elegans*, con la finalidad de evaluar el porcentaje de sobrevivencia de estos

nemátodos al ponerlos en contacto con la cepa *E. coli* JM101, que posee el operón OPcr, lo que resultó en una disminución en la sobrevivencia del nemátodo aproximadamente en un 30%, al compararla con los controles negativos, lo que constató la participación del operón en la virulencia. Los *orfs* de forma individual también fueron probados en la virulencia, lo que demostró la participación diferencial de los *orfs* del operón OPcr en la virulencia, debido a que, solo los *orfs* 35, 37, 42 y en conjunto los *orfs* 35, 36 y 37, mostraron una disminución en el porcentaje de sobrevivencia de los nemátodos de un 25 a un 35%. Una vez obtenido este resultado y correlacionándolo con la predicción de la localización predicha de las proteínas codificadas por estos *orfs* en el modelo del sistema de expulsión propuesto, en el que les incluye como proteínas de secreción, se realizó un nuevo ensayo de virulencia en *C. elegans*, empleando los sobrenadantes de los cultivos bacterianos de las cepas bacterianas que contienen a los estos *orfs* clonados, resultando en una disminución de sobrevivencia cuando estos *orfs* están presentes, lo que indicó que las proteínas codificadas los *orfs* 35, 37, 42, podrían ser proteínas que son secretadas.

Con la finalidad de identificar si el producto codificado por los *orfs* 35, 37 y 42 es de origen proteico y confirmar que son proteínas de secreción, se realizaron ensayos de virulencia en *C. elegans* empleando los sobrenadantes de las cepas bacterianas que mostraron virulencia (*orfs* 35, 37, 42 y 35-37), tratados previamente con proteasas o incubados a una temperatura de 95°C con la intención de desnaturalizar las probables proteínas y así desorganizar su estructura tridimensional y por consiguiente generar la pérdida de su función. El resultado obtenido fue que no disminuyó la sobrevivencia de los nemátodos después de su incubación con los sobrenadantes tratados, lo que sugiere que las proteínas codificadas por los *orfs* 35, 37 y 42 son secretadas e inducen virulencia, pudiendo sugerir que estos actúan como factores de virulencia.

En conjunto estos resultados demuestran la participación del operón OPcr de pUM505 en la resistencia a quinolonas y en la virulencia. Así mismo, este trabajo mostró la participación de *orfs* individuales del operón de forma diferencial en

ambos procesos la resistencia a quinolonas y virulencia, lo que puede atribuirse a la estructura y localización predicha de las proteínas a las que codifican o a la forma en la que son regulados.

Aunque quedan muchos puntos claves por indagar, para saber con precisión la forma en la que se organiza y funciona este operón, esta investigación, es un primer paso para que se continúe la búsqueda de información respecto a si es posible que el operón OP_{cr} pudiera estar involucrado en otras funciones, por ejemplo si el sistema codificado por el operón pudiera estar expulsando compuestos tóxicos u otros antibióticos y el mecanismo empleado para su función.

Esta asociación entre la resistencia y la virulencia, es beneficiosa para las bacterias, sin embargo, desde el punto de vista clínico podría ser mortal en los pacientes inmunodeprimidos. La presencia de genes de resistencia a antibióticos y de virulencia en plásmidos permite la propagación de estos mecanismos mediante la transferencia horizontal de genes, permitiendo la selección de ambas funciones y la adaptación de las bacterias que los contienen.

10. CONCLUSIÓN

Los *orfs* 35, 36 y 37 forman parte de un operón de nueve genes que se extiende desde el *orf* 34 al *orf* 42 denominado OPCR. Este operón es encontrado en un bloque de estructura de mosaico, de la isla de patogenicidad del plásmido pUM505.

El operón OPcr además de incrementar la resistencia a quinolonas es capaz de conferir virulencia a la cepa de *E.coli* JM101.

11. BIBLIOGRAFIA

Álvarez, H.D.A., Garza, M.G.S., Vázquez, L.R. (2015). Quinolonas. Perspectivas actuales y mecanismos de resistencia. *Quinolones. Nowadays perspectives and mechanisms of resistance. Rev Chil Infectol.* 32(5):499-504.

Andersson, M.I, MacGowan, A.P. (2003). Development of the quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 1:1-11.

Andriole, V.T. (2005). The Quinolones: Past, Present, and Future. *Clin Infec Dis.* 41(2):S113–9.

Ball, P. (2000). Quinolone generations: natural history or natural selection? *J Antimicrob Chemother.* 46:17-24.

Beceiro, A.M.T., Bou, G. (2012). Resistencia a los antimicrobianos y virulencia, ¿una asociación beneficiosa para el mundo microbiano? *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 30(8) :492-499.

Beisswenger, C., Honecker, A., Kamyschnikow, A., Bischoff, M., Tschernig, T., Bals R. (2014). Moxifloxacin modulates inflammation during murine pneumonia *Respir Res.*15(1):82.

Bolon, M.K. (2011). *The Newer Fluoroquinolones. Med Clin North Am.* 95(4):793-817.

Chávez, J.V.M., García, J.P., López, Y., Meza, C. V., Ramírez, D.M.I. (2020). Identification of essential residues for ciprofloxacin resistance of ciprofloxacin-modifying enzyme (CrpP) of pUM505. *Microbiology.* 166(4):367-374.

Chávez, J.V.M., Hernández, R.K.C., Romo, R.P., Pérez,G.R.V., Campos,G.J., Gutierrez,C.J.F., García, M.J.P., Meza,C. V., Silva, S. J., Ramírez, D.M.I. (2018).

CrpP is a novel ciprofloxacin-modifying enzyme encoded by the *Pseudomonas aeruginosa* pUM505 Plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 62(6): e02629-17.

Choi, U., Lee, C.R. (2019). Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* 10:953.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 2(5):414-424.

Drlica, K., Hiasa, H., Kerns, R., Malik, M., Mustaev, A., Zhao, X. (2009) Quinolones: action and resistance updated. *Curr Top Med Chem.* 9(11): 981-998.

Drlica, K., Malik, M., Kerns, R.J., Zhao, X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(2):385-392.

Emmerson, A.M., Jones, A.M. (2003). The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother.* 1:13-20.

Feng, X., Oropeza R., Kenney, L. (2003). Dual regulation by phospho-OmpR of *ssrA/B* gene expression in *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol.* 48(4), 1131-1143.

Ferrero, L., Cameron, B., Manse, B., Lagneaux, D., Crouzet, J., Famechon, A., Blanche, F. (1994). Cloning and primary structure of *Staphylococcus aureus* DNA topoisomerase IV: a primary target of fluoroquinolones. *Mol Microbiol.* 13(4):641-653.

Hacker, J., Kaper, J. 1999. The Concept of Pathogenicity Islands, p 1-11. In Kaper J, Hacker J (ed), *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/9781555818173.ch1

Hacker, J., Kaper, J.B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiology.* 54(1):641-679.

Haj, K.A.B., Moissenet, D., Thien, H.V., Khedher, M. (2011). Les facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*: mécanismes et modes de régulations. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and modes of regulation. *Ann Biol Clin.* 69(4): 393-403.

Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A.H., Sørensen, S.J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemotherapy.* 48(9):3332-7.

Hardalo, C., Edberg, S.C. (1997). *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Crit Rev Microbiol.* 23(1):47-75.

He, J., Baldini R.L., Déziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H.M., Rahme, L.G. (2004). The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(8):2530-2535.

Heddle, J., Maxwell, A. (2002). Quinolone-binding pocket of DNA gyrase: role of GyrB. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(6):1805-15.

Hernández, A., Sánchez, M.B., Martínez, J.L. (2011). Quinolone resistance: much more than predicted. *Front Microbiol.* 2:22.

Hernández, R. K.C., Chávez, J. V.M., Valle, M. M.I., Patiño, M. J.A., Díaz, P.S.P., Jácome, G. I.E., Ortiz, A. R., Meza, C. V., Ramírez, D.M.I. (2017). Plasmid pUM505 encodes a Toxin–Antitoxin system conferring plasmid stability and increased *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Microb Pathog.* 112:259-268.

Hugh, R., Leifson, E. (1964). The proposed neotype strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon.* 14 (2): 69-84 doi: 10.1601/nm.2553

Izoré, T., Job V., Dessen, A. (2011). Biogenesis, Regulation, and Targeting of the Type III Secretion System. *Structure.* 19(5):603-612.

Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C., Stanke, F., Larbig, K., Heeb, S., Schöck, U., Pohl, T.M., Wiehlmann, L., Tümmler, B. (2010). Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *J Bacteriol.* 192(4):1113-21.

Knapp, S., Hacker, J., Jarchau, T., Goebel, W. (1986.) Large, unstable inserts in the chromosome affect virulence properties of uropathogenic *Escherichia coli* O6 strain 536. *J Bacteriol.*168(1):22-30.

Lamont, L.I., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., Vasil, M.L. (2002). Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginos*. *Proc Natl Acad Sci.* 99(10):7072-7077.

Li, J., Zhang, H., Ning, J., Sajid, A., Cheng, G., Yuan, Z., Hao, H. (2019). The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob Resist Infect Control.* 8:44.

Lindeberg, M., Stavrinos, J., Chang, J.H., Alfano, J.R., Collmer, A., Dangl, J.L., Greenberg, J.T., Mansfield, J.W., Guttman, D.S. (2005). Proposed guidelines for a unified nomenclature and phylogenetic analysis of type III hop effector proteins in the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant Microbe Interact.* 18(4):275-282.

Lupo, A., Haenni, M., Madec, J-Y. (2018). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Microbiol Spectr.* 6(3).

Martinez, J.L., Sanchez, M.B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., Alvarez-Ortega, C. (2009). Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev.* 33(2):430-449.

Mahendra, K. P., Kirti, J., Supreet, S. Control of MarRAB Operon in *Escherichia coli* via Autoactivation and Autorepression. *Biophys J.*109(7):1497-1508.

Kunonga, N.I., Rodney, J.S., Crupper, S.S. (2000). Prevalence of the multiple antibiotic resistance operon marRAB In the genus Salmonella. *FEMS Microbiology Letters*.187(2), 155-160.

Nordmann, P., Poirel, L. (2005). Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 56(3):463-469.

Ochoa, S.A., López, F.M., Escalona G., Cruz, A.C., Dávila, L.B., López, B.M., Jiménez, T.Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández, R.C., Xicohtencatl, J.C. (2013). Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 70(2):138-150

Osbourn, A. E., Field, B. (2009) Operons. *Cell Mol Life Sci*. 66(23):3755-75.

Palleroni, N.J. (2010). The *Pseudomonas* Story. *Environ Microbiol*. 12(6):1377-1383.

Paz, Z. V. M., Mangwani, M. S., Martínez, M. A., Álvarez, H. D., Solano, G. S.G., Vázquez, L. R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Pseudomonas aeruginosa: Pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection. Rev Chilena Infectol*. 36(2):180-189.

Ramírez, D. M. I., Díaz, M. A., Meza, C. V., Johnstone, L., Cervantes, C., Rensing, C. (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid*. 66(1):7-18.

Redgrave, L.S., Sutton, S.B., Webber, M.A., Piddock, L.J.V. (2014). Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*. 22(8):438-445.

Rodríguez, A. E., Hernández, R. K. C., Díaz, P. S. P., Díaz, M. A., Chávez, M. M.P., Meza, C. V., Ortiz, A. R., Cervantes, C., Ramírez, D. M.I. (2016). Genes from pUM505 plasmid contribute to *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 109(3):389-396.

Salah, F.D., Soubeiga, S.T., Ouattara, A.K., Sadjji, A.Y., Metuor-Dabire, A., Obiri-Yeboah, D., Banla-Kere, A., Karou, S., Simpore, J. (2019). Distribution of quinolone resistance gene (*qnr*) in *ESBL*-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control*. 8:104.

Schmidt, H., Hensel, M. (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clin Microbiol Rev*. 17(1):14-56.

Sharma, P., Haycocks, J.R.J., Middlemiss, A.D., Kettles, R.A., Sellars, L.E., Ricci, V., Piddock, L.J.V., Grainger, D.C. (2017). The multiple antibiotic resistance operon of enteric bacteria controls DNA repair and outer membrane integrity. *Nature Communications*, 8(1), 1444.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E., Lory, S., Olson, M.V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406(6799):959-964.

Sulavik, M.C., Dazer, M., Miller, P.F. (1997). The *Salmonella typhimurium* mar locus: molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence. *Journal of Bacteriology*, 179(6), 1857-1866.

Swingle, B., Thete, D., Moll, M., Myers, R.C., Schneider, D.J., Cartinour, S. (2008). Characterization of the PvdS-regulated promoter motif in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 reveals regulon members and insights regarding

PvdS function in other pseudomonads. *Mol Microbiol.* 68(4):871-89. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(10):7072-7077.

Tillotson, J.S. (1996). Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J Med Microbiol.* 44(5):320-324.

Tran, J.H., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. (2005). Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnra with *Escherichia coli* topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(7):3050-3052.

Tsutsumi, K., Yonehara, R., Ishizaka-Ikeda, E., Miyazaki, N., Maeda, S., Iwasaki, K., Nakagawa, A., Yamashita, E. (2019). Structures of the wild-type MexAB–OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nat Commun.* 10(1):1520.

Vetting, M.W., Hegde, S.S., Fajardo, J.E., Fiser, A., Roderick, S.L., Takiff, H.E., Blanchard, J.S. (2006). Pentapeptide repeat Proteins. *Biochemistry.* 45(1):1-10.

Walldéna, K., Williams, R., Yanb, J., Lian, P.W., Wanga, L., Thalassinob, K., Orlova, E.V., Waksmana, G. (2012). Structure of the VirB4 ATPase, alone and bound to the core complex of a type IV secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(28):11348-53.

Weinstein, R.A., Hooper, D.C. (2005). Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologists. *Clin Infect Dis.* 40(12):1811-1817.

Wohlkonig, A., Chan, P.F., Fosberry, A.P., Homes, P., Huang, J., Kranz, M., Leydon, V.R., Miles, T.J., Pearson, N.D., Perera, R.L., Shillings, A.J., Gwynn, M.N., Bax, B.D. (2010). Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat Struct Mol Biol.* 17(9):1152-1153.

Xu, Y., Moeller, A., Jun, S-Y., Le, M., Yoon, B-Y., Kim, J-S., Lee, K., Ha, N-C. (2012). Assembly and channel opening of outer membrane protein in tripartite drug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J Biol Chem.* 287(15):11740-11750.

Yamane, K., Wachino, J-I., Suzuki, S., Arakawa, Y. (2008). Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(4):1564-1566.

Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, M., Nakamura, S. (1990). Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 34(6): 1271-1272.

Yoshida, T., Yamamoto, Y., Orita, H., Kakiuchi, M., Takahashi, Y., Itakura, M., Kado, N., Mitani, K., Yasuda, S., Kato, H., Itoh, Y. (1996). Studies on quinolone antibacterials. IV. Structure-activity relationships of antibacterial activity and side effects for 5-or8-substituted and 5,8-disubstituted-7-(3-amino-1-pyrrolidiny)-1-cyclopropyl-1, 4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *Chem Pharm Bull.* 44(5):1074-1085.