

UCH-FC
MAG - B
B 826
C. 1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS



**ESTUDIOS FENOTÍPICOS DE LA VIRULENCIA DE
Pseudomonas aeruginosa PAO1 UTILIZANDO COMO MODELO
DE INFECCIÓN LA AMEBA *Dictyostelium discoideum*.**

**Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en Cumplimiento Parcial de los Requisitos
Para Optar al Grado de**

Magister en Ciencias Biológicas

Por

Gloria Catalina Bravo Toncio

Director de tesis: Dr. Francisco P. Chávez Espinosa

Mayo de 2015

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Gloria Catalina Bravo Toncio

Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 23 de Abril de 2015.

Director de Tesis:

Dr. Francisco P. Chávez E.



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Marcelo Baeza, Presidente

Dr. Victor Cifuentes

A blue ink signature, likely belonging to a member of the thesis evaluation commission, written over a dotted line.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Microbiología de Sistemas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, y fue financiada por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico: Proyecto FONDECYT Regular 1120209, y por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica: Beca de Magister Nacional para Profesionales de la Educación 2012 CONICYT (501200175).

"Todo parece imposible hasta que se hace"



Nelson Mandela

...no se puede lograr nada si no se tiene un objetivo claro y definido...
...el éxito no es una cuestión de talento, sino de perseverancia...
...la vida es un viaje, no un destino...
...la libertad no es la ausencia de prisiones, sino la ausencia de miedo...
...la verdadera libertad es la libertad de la mente...
...la justicia no es un ideal abstracto, sino un principio que guía nuestras acciones...
...la dignidad humana es el fundamento de toda sociedad justa...
...la esperanza es el más poderoso de los sentimientos...
...la fe es el primer paso hacia el éxito...
...la humildad es la base de la sabiduría...
...la paciencia es la virtud de los grandes líderes...
...la honestidad es la piedra angular de la confianza...
...la integridad es el sello de un carácter fuerte...
...la generosidad es el camino hacia la felicidad...
...la compasión es el lenguaje de los corazones...
...la empatía es el puente entre las culturas...
...la tolerancia es el pilar de una sociedad democrática...
...la justicia social es el sueño de los pueblos...
...la equidad es el principio de la justicia...
...la igualdad es el fundamento de la libertad...
...la fraternidad es el espíritu de la humanidad...
...la solidaridad es el vínculo que nos une...
...la cooperación es la fuerza que nos impulsa...
...la colaboración es el camino hacia el progreso...
...la innovación es el motor del cambio...
...la creatividad es el alma del arte...
...la curiosidad es el deseo de aprender...
...la humildad es la base de la sabiduría...
...la paciencia es la virtud de los grandes líderes...
...la honestidad es la piedra angular de la confianza...
...la integridad es el sello de un carácter fuerte...
...la generosidad es el camino hacia la felicidad...
...la compasión es el lenguaje de los corazones...
...la empatía es el puente entre las culturas...
...la tolerancia es el pilar de una sociedad democrática...
...la justicia social es el sueño de los pueblos...
...la equidad es el principio de la justicia...
...la igualdad es el fundamento de la libertad...
...la fraternidad es el espíritu de la humanidad...
...la solidaridad es el vínculo que nos une...
...la cooperación es la fuerza que nos impulsa...
...la colaboración es el camino hacia el progreso...
...la innovación es el motor del cambio...
...la creatividad es el alma del arte...
...la curiosidad es el deseo de aprender...

**A mi familia; amigos y todos quienes confiaron en mí
ayudándome a lograr este objetivo.**

Gracias de corazón

Catalina

AUTOBIOGRAFÍA



Nací un 13 de Noviembre de 1987, en la ciudad de Rancagua; y crecí en Rengo entre tuercas y motores. La más pequeña de la casa, siempre muy apegada a mi familia, en especial a mi mamá Gloria (a quien llamo cariñosamente “*hija*”); cómo olvidar su rostro cuando me llamaron de la Universidad Católica del Maule, para anunciarme que había sido aceptada en la Carrera de Pedagogía en Ciencias con mención en Biología, y por lo tanto, debía irme a vivir a Talca. Fue difícil estar lejos de mi familia, sobre todo al principio, pero fue una experiencia que me hizo madurar mucho.

Durante el desarrollo de mi Carrera, supe que seguiría estudios de Post-grado para perfeccionarme en el área que me encantó: la Microbiología.

Al egresar, me desempeñé como docente en un Liceo de Rengo, pero jamás salió de mi mente el Magister. Fue entonces cuando ingresé a la página de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile y encontré lo que buscaba: Magister en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología. Sin dudarle comencé a reunir todo para postular. Pero, necesitaba un profesor que me aceptara en su Laboratorio para poder hacer efectiva la postulación...qué complicado si no estudié allí, por lo tanto, no me conocen, y era arriesgado aceptarme. Fue entonces cuando luego de mucho escribir,

recibo la respuesta del Dr. Álvaro Glavic, quien me señala que entiende mi situación y que acepta ser mi tutor.

Finalmente, fui aceptada en el Programa, y además beneficiaria de la Beca Conicyt de Magister en Chile para Profesionales de la Educación; mi felicidad fue mayúscula.

Ahora comenzaba la travesía: una profesora de Biología, sin conocimientos profundos sobre el trabajo en el Laboratorio, incursionando en el mundo de la investigación en Microbiología.

Ha sido un camino largo y arduo, con altos y bajos, donde debí aprender muchas cosas desde cero, pero que me han enriquecido como profesional. Me siento orgullosa de ser Pedagoga por vocación y haberme especializado en Microbiología y en esta Universidad; habiendo desarrollado y enseñado a más personas, el modelo biológico con la ameba social *D. discoideum*.

Sin duda alguna, este postgrado ha sido una experiencia grandiosa, que me ha hecho crecer personal y profesionalmente; estoy sumamente agradecida por todas las oportunidades y bendiciones que he recibido en estos años.

Mil gracias a todos los que han formado parte de esta historia!!

GFAGs!!!

AGRADECIMIENTOS

Quiero partir agradeciendo a Dios y a mi familia, y en especial a mi mamá Gloria, por su apoyo incondicional.

A mis profesores de pre-grado de la Universidad Católica del Maule, Dr. Luis Ramírez, Dr. Luis Miño y Dr. Victor Monzón, quienes fueron mis maestros, amigos y han estado presente durante toda esta etapa formativa.

Al profesor Dr. Álvaro Glavic, gracias a quien pude postular a este programa de Magister.

A mi tutor Dr. Francisco Chávez, por haberme dado la oportunidad y la confianza de formar parte de su Laboratorio y proponerme desarrollar un trabajo tan novedoso con la ameba social *Dictyostelium discoideum*. Jamás olvidaré cuando conversamos sobre mi proyecto de Tesis, y me señaló que el primer desafío consistía en estandarizar el modelo, porque yo sería la primera en trabajar con esta ameba. Al inicio tuve algo de temor, ambos sabíamos que, siendo pedagoga y no científica el riesgo de fracasar era alto. Ingresé al mundo de la investigación en microbiología donde tuve que aprender casi todo desde cero. Sin embargo, durante el desarrollo de esta tesis los resultados fueron satisfactorios, no sólo instaurando exitosamente el modelo en el Laboratorio de Microbiología de Sistemas (Sysmicrolab), sino que también desarrollando un Manual de protocolos y enseñando a mis compañeros cómo trabajar con la ameba, entre otras actividades, como participar en una actividad práctica del Curso Biología del Desarrollo gracias a la cordial invitación del Dr. Juan Fernández, donde pude recordar cuánto me gusta enseñar!

A la profesora Marcela Urzúa por invitarme a ser parte de Actividades de Extensión en Colegios de la Región, mostrando lo que hacemos en el Laboratorio con *D. discoideum*, donde pude corroborar que la divulgación de la Ciencia es una buena

herramienta para reencantar a los estudiantes; factor clave para decidir estudiar este postgrado.

A l@s grandes amig@s que hice en mi paso por esta Universidad, en especial a quienes tuvieron la enorme disposición y paciencia para enseñarme y apoyarme en todo lo que fuese necesario para comenzar esta travesía con *Dictyostelium*. Ustedes han sido muy importantes en este camino, les estaré agradecida por siempre por todo el cariño y gratos momentos vividos!!!

Finalmente, quiero agradecer a tod@s quienes formaron parte de mi día a día en la Universidad; todas las situaciones vividas me hicieron crecer como persona y como profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 y sus factores de virulencia	1
1.2. Los Polifosfatos y su relación con la virulencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
1.3. La síntesis de los polifosfatos como blanco para el diseño de drogas anti-virulencia bacteriana	9
1.4. <i>Dictyostelium discoideum</i> como modelo hospedero-patógeno alternativo.....	13
1.5. HIPÓTESIS	19
1.6. OBJETIVOS	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. Cepas bacterianas.....	21
2.2. Cepa de <i>Dictyostelium discoideum</i>	22
2.3. Medios de Cultivo	22
2.3.1. Medios de cultivo bacteriano	22
2.3.2. Medios de cultivo para la ameba <i>Dictyostelium discoideum</i>	23
2.3.3. Determinación de las condiciones óptimas para evaluar la virulencia bacteriana sobre el desarrollo social de <i>D. discoideum</i>	25
2.3.4. Evaluación del efecto anti-virulencia de las moléculas diseñadas <i>in silico</i> contra la PPK1 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	27

2.4. Evaluación de la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en los experimentos de desarrollo social con <i>D. discoideum</i>	28
3. RESULTADOS	30
3.1. Desarrollo de un método a gran escala para evaluar la influencia de <i>P. aeruginosa</i> en el desarrollo social de <i>D. discoideum</i>	30
3.2. Evaluación de la virulencia de mutantes de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en <i>D. discoideum</i>	34
3.2.1. Crecimiento y desarrollo de <i>D. discoideum</i> sobre mutantes de <i>P. aeruginosa</i> deficientes en la síntesis de los poliP	35
3.2.2. Crecimiento y desarrollo de <i>D. discoideum</i> sobre mutantes de <i>P. aeruginosa</i> deficientes en la síntesis de los sideróforos (pioverdina y pioquelina) y del pigmento tóxico piocianina	38
3.3. Efecto anti-virulencia de moléculas químicas diseñadas <i>in silico</i> para inhibir la enzima PPK1 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	42
4. DISCUSION	50
4.1. <i>Dictyostelium discoideum</i> como modelo hospedero-patógeno para evaluar la virulencia bacteriana	50
4.2. <i>Dictyostelium discoideum</i> como modelo para evaluar la efectividad de moléculas anti-virulencia bacteriana	57
5. CONCLUSIONES	65
6. REFERENCIAS	66
7. ANEXOS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Polifosfato inorgánico (poliP)	6
Figura 2. Morfogénesis del ciclo de vida de la ameba social <i>Dictyostelium discoideum</i> ...	15
Figura 3. Estadios del ciclo de vida de la ameba <i>D. discoideum</i> observados en los experimentos	29
Figura 4. Crecimiento y desarrollo de <i>D. discoideum</i> sobre co-cultivos con 25% y 50% de <i>P. aeruginosa</i> en placas con agar N.....	32
Figura 5. Protocolo experimental para evaluar el efecto de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en el desarrollo social de <i>D. discoideum</i>	34
Figura 6. Crecimiento y desarrollo de <i>D. discoideum</i> sobre mutantes de <i>P. aeruginosa</i> deficientes en la síntesis de los polifosfatos.....	37
Figura 7. Crecimiento y desarrollo de <i>D. discoideum</i> sobre mutantes de <i>P. aeruginosa</i> deficientes en la síntesis de sideróforos (pioverdina y pioquelina)	39
Figura 8. Crecimiento y desarrollo de <i>D. discoideum</i> sobre mutantes de <i>P. aeruginosa</i> deficientes en la síntesis del pigmento tóxico piocianina	41
Figura 9. Requisitos que deben cumplir los compuestos anti-virulencia que tienen como blanco la enzima PPK1 de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, evaluados en placa	44
Figura 10. Efecto de las moléculas químicas diseñadas <i>in silico</i> , en la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 silvestre (A) y sus Efectos secundarios (B), evaluados en el modelo <i>D. discoideum</i>	46

Figura 11. Efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus Efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*.....47

Figura 12. Efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus Efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*.....48

Figura 13. Esquema del ensayo validado en este estudio para evaluar a gran escala el efecto en la virulencia bacteriana de compuestos inhibidores de la PPK1 utilizando a *D. discoideum* como modelo biológico63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.....21

Tabla 2. Condiciones evaluadas para los ensayos de virulencia bacteriana26

Tabla 3. Crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* sobre las cepas control31

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos con los 14 compuestos inhibidores en cuanto a su efecto antibiótico, anti-virulencia, y efectos secundarios en el modelo *D. discoideum*.....49

ABREVIATURAS

AHL	Acil-Homoserina Lactonas
DO_{600nm}	Densidad óptica a 600 nm
<i>Ka</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>
NCI	National Cancer Institute
NIH	National Institutes of Health
PAO1 - PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1
PGS ↑Pi	Medio de cultivo PGS alto fosfato
poliP	Polifosfato inorgánico
QS	Quorum Sensing
Rpm	Revoluciones por minuto
TTSS	Sistemas de Secreción

RESUMEN

El aumento y la propagación de bacterias patógenas resistentes a múltiples antibióticos es un motivo de alarma mundial y ha evolucionado los mecanismos bacterianos de resistencia a los antibióticos. En la actualidad, la mayoría de los antimicrobianos existentes en el mercado o en desarrollo clínico sólo se centran en un pequeño número de procesos bacterianos esenciales, tales como la síntesis de proteínas, las rutas metabólicas centrales y la función de la membrana y pared celular. Debido al aumento de la resistencia a los antibióticos que actúan sobre estos pocos objetivos, hay una urgente necesidad de buscar nuevas estrategias celulares para combatir las infecciones bacterianas. La estrategia de afectar la virulencia bacteriana (anti-virulencia) sin afectar la viabilidad celular ha sido una estrategia novedosa. Sin embargo, se necesitan nuevos blancos moleculares que puedan cumplir con estos objetivos.

Pseudomonas aeruginosa, es un patógeno oportunista capaz de colonizar un amplio rango de ambientes, y el causante de una serie de infecciones agudas o crónicas en los humanos. Una de sus principales características es que posee un arsenal de factores de virulencia, entre los que destacan los pigmentos tóxicos como sideróforos y el pigmento piocianina, agentes clave en el proceso infeccioso. Además, *P. aeruginosa* presenta una resistencia intrínseca y adaptativa a numerosos antibióticos, lo que dificulta los tratamientos médicos y la convierten en un modelo de estudio para evaluar la resistencia microbiana a los antibióticos.

Mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en el metabolismo de los polifosfatos (poliP), específicamente en el gen *ppk1*, que sintetiza los poliP a partir de ATP,

presentan defectos en distintos procesos celulares, como la motilidad, la comunicación celular, la formación de biopelículas, y la virulencia. Además, resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio indican que el mutante *ppk1-* en *P. aeruginosa* PAO1 es sensible a múltiples antibióticos y a distintos tipos de estrés, además de ser atenuado en su virulencia en hospederos alternativos como el pez cebra (*Danio rerio*) y el nemátodo *Caenorhabditis elegans*.

Teniendo en cuenta que la enzima PPK1 no es una proteína esencial para la célula pero está involucrada en la virulencia y la persistencia en *P. aeruginosa* y en numerosos patógenos; la síntesis de los poliP y particularmente la PPK1 constituye un blanco molecular promisorio para la búsqueda y el diseño de nuevos antimicrobianos de amplio espectro que no apunten a erradicar al patógeno, sino a reducir su virulencia y persistencia.

En este trabajo, desarrollamos una nueva metodología para evaluar a gran escala la virulencia de *P. aeruginosa* mediante el estudio del desarrollo social de la ameba *D. discoideum*. Nuestro método nos permitió evaluar la virulencia de mutantes de la síntesis de los poliP y de la síntesis de los sideróforos y pigmentos tóxicos como pioquelina, pioverdina y piocianina.

Finalmente, y con un enfoque en el desarrollo de moléculas anti-virulencia dirigidas contra la enzima PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1, utilizamos a *D. discoideum* como modelo hospedero-patógeno. Nuestro enfoque considera la selección de moléculas que 1) no maten a la bacteria patógena (*P. aeruginosa*), 2) no afecten al hospedero (*D. discoideum*) ni a las bacterias beneficiosas (*K.*

aerogenes) y 3) interrumpan la producción de factores de virulencia que dañan al anfitrión.

En este trabajo, se demuestra que la ameba social *D. discoideum* es un modelo efectivo y sencillo para evaluar la virulencia de la bacteria patógena *P. aeruginosa* PAO1. Esto permitió la búsqueda de nuevas moléculas que disminuyeron la virulencia bacteriana *in vivo* en este modelo alternativo, y que luego pueden ser corroboradas en modelos de mamíferos.

ABSTRACT

The increase and spread of multi-drug-resistant (MDR) pathogens, which have evolved resistance mechanisms against specific antibiotics, is a cause for alarm. Today, the majority of existing antimicrobials on the market or in clinical development only focus on a small number of essential bacterial processes such as protein synthesis, central metabolic pathways and cell membranes function. With an increasing rate of resistance to different drugs that act upon those few targets, there is an urgent need to search for novel targets. The selection of the correct cellular or molecular target with non-vital functions but related with the production of virulence factors is very important.

P. aeruginosa is an opportunistic pathogen, able to colonize a wide range of environments, and it is the cause of a number of acute or chronic infections in human. One of its main features is the number of virulence factors, such as toxic pigments such as siderophores, and pyocyanin pigment, all of them key players in the infective process. In addition, *P. aeruginosa* has an intrinsic resistance to many antibiotics, making medical treatments difficult.

It has been reported that *ppk1* mutants of *P. aeruginosa* are deficient in the synthesis of polyP and display several cellular defects including motility, cell communication, biofilm formation and virulence. Furthermore, phenotypic microarrays results (Biolog Inc.) previously obtained in our laboratory indicates that *ppk1*-mutant from *P. aeruginosa* PAO1 is sensitive to multiple antibiotics and different types of stress.

The social amoeba *Dictyostelium discoideum* feeds on bacteria by phagocytosis and its growth and development is affected when facing pathogenic microorganism. Previously, a host model system based on *D. discoideum* was successfully used to identify *P. aeruginosa* virulence genes. In addition, *P. aeruginosa* has been shown to use similar virulence factors when infecting mammalian hosts or *Dictyostelium* amoebae. Interestingly, *D. discoideum* is among the few eukaryotes that possess orthologs of bacterial PPK1 (DdPPK1) and mutants of DdPPK1 are deficient in development, predation and sporulation. Particularly, in *P. aeruginosa* lawn, *D. discoideum* is killed leaving an intact bacterial lawn. However, on a lawn of *Pappk1* mutant, the social amoeba is proved to be an effective predator as observed by the phagocytic plaques formed.

As PPK1 enzyme is involved in cell metabolism rather than in essential functions, it is present in the three domains of life and there is a high degree of identity between PPK1 of different pathogens; the synthesis of polyP and particularly PPK1 is a promising target for the search and the design of new broad-spectrum antimicrobials that do not kill the pathogen, but to reduce its virulence and persistence.

In this work, we establish a novel developmental assay in the social amoeba *D. discoideum* to assess *P. aeruginosa* virulence. We evaluated different mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, deficient in polyP metabolism, and synthesis of siderophore and toxic pigments such as pyochelin, pyoverdine, and pyocyanin.

With a focus in developing antivirulence molecules targeting inorganic polyP synthesis in *P. aeruginosa* PAO1 we used *D. discoideum* as a host-pathogen

model. Our approach considers the screening of molecules that 1) do not kill the bacterial pathogen, 2) avoid affecting the host and its beneficial bacteria and 3) disrupt the production of virulence factors that damage the host.

Here we demonstrate that *D. discoideum* offered a robustness and easy manipulation for an efficient host-pathogen model for the screening of anti-virulence molecules. Moreover, the amoeba anti-virulence assays in combination with developmental secondary effects tests allowed us further characterization by selecting those compounds with anti-virulence properties without cytotoxic or antibiotic effects.

In summary, we described a simple high-throughput assay using *D. discoideum* and report the first *in vivo* anti-virulence agents targeting *P. aeruginosa* PPK1 without side effects to the host or its beneficial bacteria.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y sus factores de virulencia

Pseudomonas aeruginosa, es un patógeno oportunista, Gram negativo, con una extraordinaria capacidad para sobrevivir y adaptarse a un amplio rango de ambientes (1, 2), y de infectar una gran variedad de hospederos como plantas (3), insectos (4, 5), nemátodos (6), protozoos y mamíferos, los que son susceptibles a infecciones causadas por esta cepa; revelando la naturaleza ubicua y la gran conservación de los mecanismos de virulencia para infectar a hospederos evolutivamente divergentes (7, 8, 9).

En humanos, *P. aeruginosa* se caracteriza por ser un patógeno oportunista de incidencia nosocomial, responsable de una gran variedad de infecciones tanto agudas como crónicas, en particular en individuos inmuno-comprometidos o con fibrosis quística, convirtiéndose en la principal causa de muerte en este tipo de pacientes (2, 10). Puede infectar el tracto urinario, colonizar dispositivos médicos como sondas, implantes, catéteres, heridas y quemaduras extensas e incluso provocar complicaciones sistémicas como septicemia (10, 11).

La enorme versatilidad de *P. aeruginosa*, se debe a su capacidad de producir una gran variedad de factores de virulencia, ya sea asociados a la superficie celular como el pili, el flagelo, el lipopolisacárido, el sistema de secreción tipo III (T3SS); o los productos secretados al espacio extracelular como exotoxinas, pigmentos tóxicos (sideróforos, piocianina), proteasas, ramnolípidos, entre otros. A éstos se suman, los exopolisacáridos, los mecanismos de

adherencia y la formación de biopelícula (12). Estos factores, son clave para la persistencia de la infección, permitiéndole colonizar y sobrevivir en el hospedero.

La expresión de los factores de virulencia en esta bacteria, está asociada al menos con dos rutas principales: el sistema de comunicación bacteriana conocido como "Quorum sensing" (QS) (12), y el sistema de secreción tipo III (T3SS) (14), crucial para la citotoxicidad bacteriana. El QS es un sistema ampliamente estudiado en Gram negativos como *P. aeruginosa*, el que consiste en un mecanismo de señalización celular bacteria-bacteria, mediado por moléculas auto-inductoras: *N*-acil homoserina lactonas. Está organizado de forma jerárquica, ya que el sistema *Las* (compuesto por la sintasa *LasI*, que sintetiza 3-oxo-C12-HL, que es reconocida por el regulador transcripcional *LasR*), ejerce un control positivo sobre el sistema *Rhl* (que posee una sintasa de C4-HL, *RhlI*, y el regulador *RhlR*) (15, 16), y sobre la expresión del sistema PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) (17). Cuando la densidad bacteriana alcanza cierta concentración umbral, la acumulación de las moléculas auto-inductoras en el medio extracelular, induce la transcripción del regulón "QS", entre ellos, los genes que codifican factores de virulencia (18). Este mecanismo de "QS", se cree, es un regulador esencial de la patogénesis bacteriana, ya que garantiza que ciertos factores de virulencia se sinteticen sólo cuando *P. aeruginosa* ha alcanzado una densidad umbral y pueda iniciar una infección exitosa (19). El sistema *Las* regula la expresión de diversos factores de virulencia relacionados con la fase aguda de la infección y el daño celular en el hospedero (p. ej: elastasas, exotoxinas), además de activar el sistema *Rhl* y a sí mismo, de forma que la activación del sistema *LasIR* produce una retroalimentación positiva y permite la activación más tardía del sistema

RhlIR, quien también retroalimenta positivamente la vía, además de inducir la expresión de otros genes como los responsables de la síntesis de ramnolípidos y de reprimir la expresión de los genes relacionados con el T3SS.

Por su parte, el otro sistema auto-inductor en *P. aeruginosa*, que se activa de manera similar al mediado por AHL, regula la expresión de genes relacionados con la síntesis de PQS y del pigmento tóxico piocianina. Además, las moléculas del sistema PQS han sido halladas en altas concentraciones en la membrana externa de la célula, donde forma complejos con hierro, permitiendo la acumulación de éste en la proximidad de la célula, facilitando su incorporación por los sideróforos pioverdina y pioquelina (16); esto le permitiría a la célula obtener hierro de manera rápida y eficiente.

Por otra parte, los sideróforos y pigmentos tóxicos, se han vinculado con la patogenicidad de *P. aeruginosa* a diferentes hospederos, se cree, son un factor clave en su capacidad para causar infección en éstos (factores de virulencia), sumado a que se ha detectado la presencia de sideróforos (compuestos quelantes de hierro), como pioquelina y pioverdina en pacientes infectados con esta bacteria (20, 21). Además, el pigmento tóxico piocianina, también se ha relacionado con la virulencia de *P. aeruginosa*, en ensayos de virulencia *in vivo* (22).

El sideróforo pioverdina, constituye la principal molécula quelante de hierro en *P. aeruginosa* y se ha vinculado con el inicio de la cascada de señalización responsable de la producción de varios factores de virulencia como exotoxina A y la propia pioverdina (23, 24). Se cree, que la disponibilidad de hierro y la captación del mismo vía este sideróforo, juega un papel crucial en el establecimiento de la infección (25) y el desarrollo de infecciones crónicas (26).

Por su parte, la pioquelina, pese a ser un sideróforo secundario con menor afinidad por hierro, al igual que la pioverdina, promueve el crecimiento bacteriano y actúa de forma sinérgica con esta última para causar infección (16, 23).

Por otro lado, la piocianina, un pigmento tóxico derivado de fenazinas, y característico del género *Pseudomonas*, posee una actividad citotóxica de amplio espectro hacia organismos eucariontes y procariontes; al someter a las células a condiciones de estrés oxidativo, ya que genera la formación de especies reactivas de oxígeno, superóxido y peróxido de hidrógeno. Su acción sinérgica con otros factores de virulencia, es capaz de causar infección en plantas, ratones y causar la muerte del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (3, 22).

El tratamiento de las infecciones generadas por *P. aeruginosa* en pacientes intrahospitalarios es sumamente complejo y constituye un gran desafío científico, debido a que posee una gran resistencia intrínseca a numerosos antibióticos comparada con otros Gram negativos (27, 28). Se le ha denominado como "superbacteria", debido a su enorme capacidad de generar resistencia a una amplia variedad de antibióticos (27), y también porque es capaz de infectar a una gran diversidad de hospederos (3-6, 29).

En esta bacteria, entre los mecanismos que se asocian a la resistencia a múltiples drogas, se encuentran el engrosamiento de la pared celular, el aumento de la producción de exopolisacárido. Esto, sumado a cambios en la permeabilidad de la membrana externa debido a la expresión disminuida de porinas que limita la tasa de penetración de antibióticos y el aumento del transporte activo de drogas hacia el exterior celular mediante bombas de eflujo

(RND o tipo Mex), y la transmisión horizontal de determinantes de resistencia (27, 30).

Además, en muchos patógenos, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* y *Pseudomonas aeruginosa*, se ha observado el fenómeno denominado "persistencia bacteriana", la que ha sido implicada en muchas infecciones tanto crónicas como recurrentes (31). La persistencia bacteriana – descubierta por Joseph Bigger en 1944 (32), es el fenómeno en el cual las poblaciones bacterianas sensibles a antibióticos, producen algunas células que se vuelven tolerantes a múltiples drogas de forma transitoria debido a mecanismos de dormancia (31). Es decir, cuando un cultivo de bacterias genéticamente idénticas es expuesto a un antibiótico bactericida, la mayoría de la población muere; pero luego de unas pocas horas de tratamiento, permanecen células vivas pero metabólicamente detenidas que son capaces de resistir la acción de antibióticos que tienen como blanco procesos celulares activos (32). Trabajos realizados en *E. coli*, revelaron que las células persistentes constituyen una sub-población preexistente, que se forma estocásticamente y vinculan el grado de persistencia que pueden desarrollar las bacterias, con el nivel intracelular de los polifosfatos inorgánicos (poliP).

1.2. Los Polifosfatos y su relación con la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*

El polifosfato inorgánico (poliP) es un polímero lineal formado por decenas a centenas de residuos de ortofosfato (Pi) unidos por enlaces fosfoanhídrido de alta

energía (Figura 1). Este polímero está presente en los tres dominios de la vida (Arquea, Bacteria y Eucaria) (33, 34).

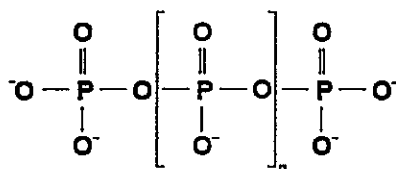


Figura 1. Polifosfato inorgánico (poliP). El valor de n puede variar dependiendo de la ubicación de la molécula en la célula y del estado metabólico de ésta (34).

En bacterias, el polifosfato es sintetizado por enzimas denominadas polifosfato quinazas, que transfieren el fosfato terminal del ATP a la cadena de poliP; siendo la polifosfato quinasa 1 (PPK1) la principal responsable de su síntesis. Pese a que el proceso es reversible, el equilibrio se encuentra desplazado hacia su producción (33). Su degradación está mediada por una exopolifosfatasa (PPX), que libera moléculas de ortofosfato desde los extremos de la cadena de poliP. En *P. aeuginosa*, además de la PPK1 y la PPX, es posible encontrar una segunda polifosfato quinasa, denominada PPK2 (34), un parólogo del gen *ppk1* capaz sintetizar poliP. No obstante, la actividad enzimática de la PPK2 difiere de la PPK1 en dos aspectos: (i) utiliza igualmente GTP y ATP como sustrato para la síntesis de poliP, y (ii) cataliza mayoritariamente la síntesis de GTP a partir del polifosfato, por lo que el equilibrio está desplazado hacia la síntesis de GTP, a una tasa varias veces superior que hacia la síntesis del poliP (34).

Tanto PPK1 como PPK2, están altamente conservadas, siendo posible hallar homólogos en más de 100 especies procariontes, muchas de ellas

patógenas. Y pese a que el poliP, se encuentra presente en todas las células vivas, hay bacterias que sólo presentan la enzima PPK1, sólo la PPK2, ambas – como es el caso de *P. aeruginosa*- o ninguna de ellas (34, 35).

Curiosamente, un número limitado de eucariontes poseen ortólogos del gen *ppk1* bacteriano, entre los que se encuentran los organismos fotosintéticos: *Ostreococcus tauri*, *O. lucimarinus*, el musgo *Physcomitrella patens*, la levadura *Candida humicola* y la ameba social *Dictyostelium discoideum*, entre otros (33, 36-39). Esta adquisición del gen *ppk1* bacteriano mediante transferencia horizontal, se cree otorgaría a estos organismos ventajas selectivas para mejorar la tolerancia a estrés en un entorno cambiante, en relación con la captura y metabolismo de compuestos con fosfato inorgánico (36).

La generación de mutantes deficientes en la enzima PPK1 en diversas bacterias, ha hecho posible distinguir otras funciones de esta macromolécula, diferentes a la de ser una fuente energética y reserva de fosfato. Se ha descrito que el polifosfato inorgánico (poliP), participa en diversos procesos celulares, que incluyen la inhibición de la degradación del RNA, su participación en la estructuración de canales de membrana y su contribución a la resistencia frente al estrés generado por agentes oxidantes, calor, cambios osmóticos, acidez, antibióticos, radiación, adaptación a ambientes extremos; y también se ha vinculado con la virulencia y la persistencia bacteriana (31, 34). Particularmente en *P. aeruginosa*, se ha reportado, que mutantes *ppk1*- de la síntesis de los poliP, son deficientes en varias funciones celulares y estructurales como la compactación del nucleóide, la distorsión de la envoltura nuclear, la motilidad, la comunicación bacteriana (quórum sensing), la formación de biopelículas, y

deficiencia en la producción de exopolisacáridos, haciéndola susceptible a la acción de antibióticos y a la desecación (12, 23, 34, 40-42).

Finalmente, y relacionado con el trabajo de esta tesis de magister, los mutantes *ppk1*- de *P. aeruginosa*, son deficientes en la producción de factores de virulencia y no son infectivos en modelo de ratón quemado y modelo ocular de ratón (12, 43). Este fenotipo avirulento se ha demostrado también en otras bacterias patógenas de importancia clínica como *Salmonella sp.*, *Shigella flexneri* (44), *Vibrio cholerae* (45), *Neisseria meningitidis* (46), *Mycobacterium tuberculosis* (47), *Helicobacter pylori* (48), *Campylobacter jejuni* (49, 50).

La enzima PPK1 ha sido ampliamente estudiada en muchos modelos bacterianos, y en contraste, poco se conoce con respecto a su parólogo PPK2. En *P. aeruginosa*, se ha caracterizado la actividad de PPK2 durante el crecimiento bacteriano. Los resultados sugieren que el aumento de la actividad de PPK2 observada durante la fase estacionaria de crecimiento (34, 35, 51) es debido a que el GTP generado, es utilizado en la síntesis del alginato (principalmente). El alginato, es un exopolisacárido esencial para la sobrevivencia en biopelículas, la adherencia y también es importante durante los procesos de patogénesis bacteriana en *P. aeruginosa*.

Como se señaló previamente, la persistencia bacteriana, emerge de eventos estocásticos que originan células que se tornan tolerantes a múltiples drogas en forma transitoria. Maisonneuve y cols. (2013) (31), afirman que el grado de persistencia bacteriana se correlaciona positivamente con el nivel intracelular de poliP, donde cepas dobles mutantes por delección del metabolismo de los poliP ($\Delta ppk1$ -*ppx*), mostraron una fuerte reducción de la persistencia a dos antibióticos

bactericidas (ciprofloxacino y ampicilina) con mecanismos de acción completamente diferentes. Similares resultados se obtuvieron con el mutante $\Delta ppk1$. En contraste, con el mutante Δppx , que acumula poliP, se observaron niveles elevados de persistencia. Por ende, la persistencia bacteriana está implicada en la virulencia de patógenos como *P. aeruginosa* y *E. coli*, que se tornan resistentes a múltiples drogas cuando crecen en un biofilm. Todos estos procesos celulares se ven afectados en bacterias mutantes deficientes en la síntesis de los poliP.

El hecho de que la alteración del metabolismo de los poliP, en particular la delección del gen *ppk1*-, no afecta la viabilidad de las células sino que tiene efectos en distintos procesos celulares relacionados con la atenuación de la virulencia de diversos microorganismos patógenos y la resiliencia de los mismos (52), convierten a la enzima PPK1 en un blanco atractivo y novedoso para la generación de nuevos compuestos antimicrobianos para el control de la virulencia en bacterias patógenas (34, 52, 53).

1.3. La síntesis de los polifosfatos como blanco para el diseño de drogas anti-virulencia bacteriana

El tratamiento de infecciones generadas por bacterias, constituye un desafío científico y médico; el uso desmesurado de antibióticos ha generado el surgimiento de cepas resistentes (MDR) o tolerantes a múltiples drogas; éstas serían las responsables de enfermedades crónicas y persistentes. La mayoría de los antibióticos utilizados en la actualidad, apuntan a erradicar el patógeno o a

interferir con su crecimiento, lo cual les interpone una fuerte presión selectiva, que se traduce en la evasión de este "ataque" creando resistencias o desarrollando persistencia, haciendo que los antibióticos no ejerzan su efecto letal, ya que el blanco celular de numerosos antibióticos letales, es mucho más vulnerable en células creciendo activamente que en las células dormantes (31, 32). Es por esto que, se hacen necesarios nuevos enfoques terapéuticos, entre los que destaca la reducción de la virulencia bacteriana, donde simultáneamente se incrementen las defensas del hospedero, en vez de exterminar al patógeno.

Una estrategia destacada en la actualidad, consiste en bloquear la virulencia bacteriana específicamente, sin matar o inhibir el crecimiento bacteriano (54, 55). Recientemente, esta estrategia anti-virulencia se ha estado explorando, teniendo como blancos la adhesión y la comunicación bacteriana con la célula hospedera y la producción de toxinas o los sistemas especializados de secreción (56). Con esta última, se buscan inhibidores que impidan la interacción con la célula hospedera, evitando el ensamblaje del sistema de TTSS, o la secreción de las proteínas efectoras. Una segunda aproximación, bastante abordada, es inhibir la comunicación bacteriana (Quorum sensing) (54, 57), degradando por ejemplo las moléculas auto-inductoras, o bloqueando la recepción de éstas. Un ejemplo de estrategia anti-virulencia que utiliza como blanco el Quorum sensing en *P. aeruginosa* es la inhibición del sensor histidina quinasa QseC (57); con ortólogos en al menos 25 patógenos de plantas y humanos. Mutantes de Qsec en numerosas bacterias tienen una virulencia atenuada en modelos animales de infección; y los compuestos con capacidad de inhibir a QseC no afectaron el crecimiento bacteriano pero generaron una reducción en la expresión de factores

de virulencia y un congruente descenso de la virulencia en los modelos de infección (57, 58).

Las estrategias que afectan la virulencia y a su vez restringen la aparición de células persistentes a antibióticos pueden ser aplicadas teniendo como blanco la síntesis de los polifosfatos inorgánicos (*ppk1*) (34, 52, 53). Debido a los defectos celulares de la bacteria deficiente del gen *ppk1*, particularmente, en la virulencia atenuada sobre el hospedero al que invade (23, 34, 52, 53); el hecho de que la enzima PPK1 esté involucrada en el metabolismo celular más que en funciones esenciales; la sensibilidad a diversos antibióticos con distintos blancos de acción (23); el estar presente solo en bacterias pero ausente en eucariontes superiores –excepto en algunos eucariontes como la ameba social *D. discoideum*, *Candida humicola*, entre otros (33, 34, 36-39, 53)-; y el alto grado de identidad entre los ortólogos de PPK1 en la mayoría de las bacterias patógenas conocidas; es que la inhibición de la síntesis del poliP, específicamente de la enzima PPK1, constituye un blanco promisorio para la construcción de compuestos anti-virulencia de amplio espectro, cuyo objetivo no sea la muerte del patógeno sino atenuar su virulencia hacia el hospedero (Chávez *et al.*, 2011) (52).

Estos compuestos dirigidos contra la virulencia bacteriana, deberían poseer un amplio espectro de acción y baja toxicidad (54). Debido a que la enzima PPK1 no ha sido encontrada en células de mamíferos, las drogas que tengan como blanco la síntesis de los poliP, son menos probables de generar efectos secundarios así como resistencia a antibióticos (12, 34).

Los ensayos biológicos deben ser capaces de demostrar la acción de la droga contra el patógeno y también la ausencia de toxicidad hacia el hospedero. Encontrar nuevos inhibidores de la PPK1, que afecten tanto la actividad de PPK1 así como el contenido de poliP en la célula, se espera, causen fenotipos similares a los observados en bacterias mutantes *ppk1* (52). De este modo, en este trabajo buscamos moléculas que cumplan con ciertos requisitos relacionados con su efecto sobre la virulencia bacteriana pero también sobre el hospedero y su bacteria comensal.

Previamente en nuestro laboratorio y mediante el diseño *in silico* de drogas, se lograron encontrar posibles inhibidores de la PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1 (*PaPPK1*) (Chávez *et al.*, 2011) (52). Para esto fue necesario primero, modelar la *PaPPK1* a partir de la estructura 3D conocida de la PPK1 de *E. coli* (53). La estructura obtenida fue utilizada para la búsqueda de aquellas moléculas con la capacidad de unirse y desplazar al ATP del sitio activo de la *PaPPK1*. Para esto, fueron utilizadas las 1596 moléculas del Diversity Set II (National Cancer Institute, National Institutes of Health). Estas moléculas son farmacóforos representativos de más de 140 mil compuestos y tienen la ventaja de estar disponibles gratuitamente previa solicitud institucional. Mediante los programas CHARMMbased CDOCKER y LibDock (Accelrys), se constató que varias moléculas fueron compatibles con el sitio activo de la estructura cristalina de la PPK1 y, por lo tanto, podrían ser inhibidores de su actividad enzimática. Resultados preliminares, indicaron que *in vitro*, estos químicos pueden inhibir fuertemente la actividad de esta enzima (52). En este estudio, se evaluó el efecto de las 32 moléculas que obtuvieron mejores resultados en la búsqueda virtual.

1.4. *Dictyostelium discoideum* como modelo hospedero-patógeno alternativo

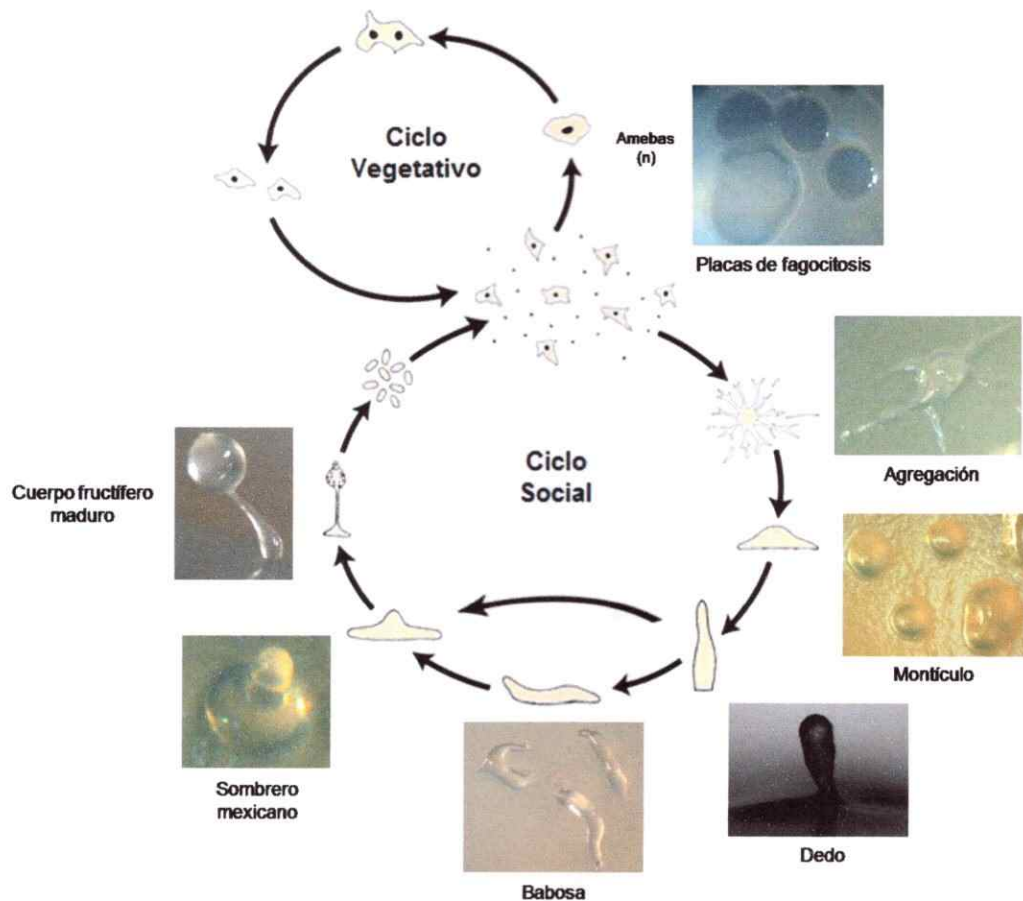
Los mamíferos como por ejemplo ratones y conejos, han sido utilizados como hospederos, ya que "imitan" de manera más cercana la situación de un paciente humano infectado. No obstante, estos experimentos son problemáticos en la práctica y acarrear dilemas éticos. Es por esto, que nuevos hospederos (vertebrados e invertebrados) no mamíferos representan una buena alternativa ya que permiten una evaluación de la virulencia bacteriana mucho más sencilla evitando los problemas éticos (8, 9, 59-61); por ello, en este trabajo, se propone la utilización de la ameba social *Dictyostelium discoideum* como modelo biológico alternativo.

Dictyostelium discoideum, es un organismo unicelular de vida libre capaz de desarrollarse en una estructura multicelular con el fin de sobrevivir a las condiciones ambientales desfavorables. Es una ameba social del suelo (10-20 micras), con un pequeño genoma haploide (34Mb), que pasa la mayor parte de su vida en el ciclo vegetativo, dividiéndose periódicamente por mitosis y alimentándose de bacterias y otros microorganismos que habitan en el suelo (62). Cuando la fuente de alimento es escasa, las amebas vegetativas inician un programa de desarrollo social (ciclo social), en el cual, las células "hambrientas", producen un quimio-attractante: AMPc, el cual actúa como una señal para inducir el agrupamiento mediante quimiotaxis, de aproximadamente 10^5 células vecinas formando un agregado multicelular (inicio del ciclo social) (Figura 2), el que resulta en la formación de una estructura cada vez más compacta (montículo), el cual



luego origina un montículo con punta el que posteriormente se extiende para formar un "dedo". Este último puede caer para dar origen a una babosa migratoria fototáctica. Ya sea, el dedo o la babosa se contraen y la punta anterior se eleva (sombrero mexicano), para culminar el ciclo con la formación de un cuerpo fructífero maduro, donde el 20% de las células muere, formando un tallo que eleva la cabeza –soro- conteniendo el 80% de las células en forma de esporas, para asegurarles un mejor lugar para su esporulación y dispersión. Cuando el alimento esté disponible nuevamente, las esporas germinan en una ameba vegetativa, completando de este modo el ciclo de vida (63). Todo el proceso, desde la hambruna de las células vegetativas hasta la formación de un cuerpo fructífero maduro, tarda 24 horas en condiciones de laboratorio.

D. discoideum es un organismo relativamente fácil de crecer, ya que prolifera tanto en asociación con bacterias en un sustrato sólido o en un medio líquido rico. Su crecimiento óptimo es a 22°C en condiciones normales de laboratorio. En medio líquido, el desarrollo es inducido también por la escasez de alimento y ocurre bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente.



Modificado de "The life cycles of *Dictyostelium discoideum*" by David Brown & Joan E. Strassmann. Permission: C.C. Creative Commons Attribution - Share Alike 3.0

Figura 2. Morfogénesis del ciclo de vida de la ameba social *Dictyostelium discoideum*. Las imágenes mostradas en la figura, fueron captadas durante los experimentos llevados a cabo en este trabajo (aumentos de 0.63x y 2.5x; Olympus, Japón).

En presencia de bacterias, su tiempo de duplicación es de 4 horas aproximadamente; no obstante, para realizar ensayos de infección como los llevados a cabo en este estudio, es necesario crecer las células de *D. discoideum* en ausencia de bacterias (crecimiento axénico). Éste se produce en medio líquido rico (como por ejemplo: HL5), en el cual las amebas son capaces de crecer libres de otros organismos vivos. Las cepas derivadas de la cepa silvestre, denominadas "cepas axénicas o AX" (64, 65), tienen tasas de crecimiento más lentas que la cepa silvestre, con un tiempo de duplicación entre 8-12 horas,

dependiendo del medio, la temperatura y la presencia de drogas selectivas (66). Las cepas axénicas, pueden ser transferidas fácilmente desde condiciones de crecimiento en asociación con bacterias a cultivos axénicos; es decir, pasar de alimentarse por fagocitosis a hacerlo por macro-pinocitosis (7).

La ameba social *D. discoideum* ha sido utilizada para el estudio de procesos biológicos como la migración (67, 68), la transducción de señales (69), la fagocitosis (70, 71), la señalización durante la morfogénesis y la diferenciación celular (63, 72); y en los últimos años, se ha empleado exitosamente como un modelo para estudiar las interacciones hospedero-patógeno, así como descubrir nuevos factores de virulencia de diversas bacterias (73), entre las que destaca *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cenocepacia*, *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa* (15, 18, 19, 38, 59, 74-76). De hecho, el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, lo incluye entre los 8 sistemas modelo no mamífero, para el estudio de procesos moleculares de importancia médica (<http://www.nih.gov/science/models/>), pudiendo ser fácilmente utilizado para llevar a cabo ensayos con drogas cuyo efecto se pretende extrapolar a células humanas (77, 78). La secuenciación del genoma de *D. discoideum* (37), ha revelado numerosos ortólogos de genes implicados en enfermedades humanas y que están presentes en *Dictyostelium* pero ausentes en otros organismos estudiados comúnmente. Esto ha sido utilizado para identificar blancos moleculares para fármacos empleados en el tratamiento de enfermedades humanas como el cáncer (79), el desorden bipolar (80) y la osteoporosis (81).

Por su fácil manipulación, constituye un atractivo y probablemente, el sistema más simple para el estudio de infecciones generadas por patógenos humanos al ser un "fagocito profesional" (7, 8, 19, 82-85); y porque además, los patógenos bacterianos necesitan factores de virulencia para resistir los procesos degradativos que ocurren dentro de la ameba, los cuales están evolutivamente muy conservados (7); es decir, muchos de los mecanismos que ocupa un patógeno bacteriano para sobrevivir en el interior de una ameba son los mismos que ocupa para sobrevivir en el interior de un macrófago. Debido a la alta conservación de los mecanismos de fagocitosis y de tráfico endosomal en el transcurso de la evolución de los eucariontes, los protozoos como *D. discoideum* pueden ser considerados como una "antigua escuela de virulencia" para muchos microbios que se convirtieron posteriormente en patógenos humanos. De hecho, muchos de los factores de virulencia bacteriana requeridos para el proceso patogénico en los mamíferos son igual de importantes para la supervivencia de estos patógenos durante su interacción con los protozoos (86).

La habilidad de *D. discoideum* para crecer en asociación con bacterias sobre un sustrato sólido (agar), ha permitido el desarrollo de ensayos en placa bastante versátiles para la identificación de cepas patógenas y factores de virulencia (15, 59). En estos ensayos de virulencia en placa, se co-cultiva *D. discoideum* con la(s) cepa(s) bacteriana(s) en estudio; y el éxito de la depredación por parte de las amebas, se visualiza por la aparición de halos claros (placas de fagocitosis) sobre el césped de bacterias; y la ausencia de estas placas, revela una resistencia por parte de las bacterias a la depredación por *D. discoideum*, pudiendo indicar un fenotipo virulento. Este enfoque, ha permitido identificar con

éxito mutantes avirulentos de *B. cenocepacia*, *V. cholerae*, *P. aeruginosa* quienes presentan alterada resistencia a la depredación por parte de la ameba (19, 59, 75, 76). Empleando los protocolos mencionados por Froquet (2009) (59), permitieron observar que *D. discoideum* fue incapaz de crecer sobre cepas de *P. aeruginosa* patogénica, pero sí pudo hacerlo sobre variantes isogénicas no patógenas (por ejemplo sobre mutantes de la comunicación bacteriana –*quorum sensing*- no virulentos) (15, 18, 59, 87). Es decir, factores de virulencia que se han demostrado ser relevantes en otros hospederos, incluidos los mamíferos, también son importantes para causar daño a la ameba.

Particularmente, al comparar los resultados obtenidos con distintos hospederos modelo como *Drosophila melanogaster* (8, 88, 89), ratones (12, 43) plantas (3), *Caenorhabditis elegans* (6, 8, 22, 90, 91) y *Danio rerio* (23, 92), se confirma a *Dictyostelium* como un hospedero válido para el análisis minucioso de los mecanismos de virulencia de patógenos como *P. aeruginosa* (7, 8, 15, 18, 19, 59, 74, 75, 82, 83, 85), ya que en tales anfitriones se constató el mismo grado de virulencia de las cepas analizadas (9, 15, 18, 23, 83), además de permitir la identificación de nuevos factores de virulencia de esta cepa (18).

Particularmente, sobre algunas cepas de *P. aeruginosa*, *D. discoideum* no es capaz de crecer o lo hace en forma deficiente, sin embargo, en mutantes que se han demostrado no ser virulentos en modelos más complejos, incluidos los humanos, *D. discoideum* es capaz de crecer y formar cuerpos fructíferos con esporas (18, 38). Estos antecedentes, fueron un factor clave para utilizar la ameba *D. discoideum* como un modelo biológico para llevar a cabo esta investigación.

En consecuencia, en este trabajo de tesis, nos propusimos el uso de la ameba social *D. discoideum* para el estudio de la virulencia de numerosos mutantes en factores de virulencia de *P. aeruginosa* PAO1, incluidos los mutantes de la síntesis de los poliP (*PaPPK1* y *PaPPK2*); y además, evaluamos el efecto *in vivo* de las moléculas previamente diseñadas en la virulencia de *P. aeruginosa* silvestre, empleando también como modelo biológico esta ameba social. La importancia de utilizar este modelo, radica en que curiosamente *D. discoideum*, se encuentra entre los pocos organismos eucariontes que presentan un ortólogo del gen *ppk1* bacteriano (34, 38, 39). En un estudio previo Zhang y col. (2005) (38), demostró que mutantes del gen *Ddppk1* de *D. discoideum*, tienen niveles reducidos de poliP y presentan un desarrollo, esporulación y predación bacteriana deficientes. En contraste, *D. discoideum* silvestre, fagocita eficientemente al mutante *ppk1* de *P. aeruginosa*, pero no así a la cepa silvestre. Por lo tanto, el polifosfato inorgánico (poliP), es importante tanto para la ameba como para la virulencia de *P. aeruginosa* frente a dicho hospedero (34).

1.5. HIPÓTESIS

Dictyostelium discoideum es un modelo hospedero-patógeno efectivo para la evaluación a gran escala del efecto anti-virulencia de compuestos químicos. Las moléculas diseñadas *in silico* para inhibir la enzima PPK1 de *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de atenuar la virulencia hacia la ameba social *Dictyostelium discoideum* sin efectos secundarios.

1.6. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la virulencia de diferentes mutantes de la síntesis de los polifosfatos y de pigmentos tóxicos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; y determinar el efecto anti-virulencia de moléculas químicas diseñadas *in silico* para inhibir la PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1 en la ameba social *Dictyostelium discoideum*.

Objetivos Específicos

1. Desarrollar un modelo *Dictyostelium discoideum* - *Pseudomonas aeruginosa* que permita evaluar la virulencia bacteriana en el desarrollo social de la ameba.
2. Evaluar la virulencia en *D. discoideum* de la cepa silvestre y diferentes mutantes relacionados con la expresión de factores de virulencia como la síntesis de los poliP (*ppk1-*, *ppk2-*) y de pigmentos tóxicos (*pchF-*, *pvdF-*, *phzM-*, *phzS-*) de *P. aeruginosa* PAO1.
3. Determinar el efecto anti-virulencia de diferentes moléculas químicas diseñadas *in silico* contra la PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre utilizando la ameba *D. discoideum*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepas	Descripción	Referencia
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa silvestre	(93)
PW9826	Cepa mutante <i>ppk1</i> . Derivada de PAO1 con inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina (Mini-Tn5-Tet ^r) en el gen <i>ppk1</i> (PA5242)	(93)
PW1236	Cepa mutante <i>ppk2</i> . Derivada de PAO1 con inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina (Mini-Tn5-Tet ^r) en el gen <i>ppk2</i> (PA0141)	(93)
PW8171	Cepa mutante <i>pchF</i> . Derivada de PAO1 con inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina (Mini-Tn5-Tet ^r) en el gen <i>pchF</i> (PA4225)	(93)
PW5033	Cepa mutante <i>pvdF</i> . Derivada de PAO1 con inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina (Mini-Tn5-Tet ^r) en el gen <i>pvdF</i> (PA2396)	(93)
PW8142	Cepa mutante <i>phzM</i> . Derivada de PAO1 con inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina (Mini-Tn5-Tet ^r) en el gen <i>phzM</i> (PA4209)	(93)

PW8154	Cepa mutante <i>phzS</i> . Derivada de PAO1 con inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina (Mini-Tn5-Tet ^r) en el gen <i>phzS</i> (PA4217)	(93)
PW6882	Cepa mutante <i>rhlR</i> . Derivada de PAO1 con inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina (Mini-Tn5-Tet ^r) en el gen <i>rhlR</i> (PA3477)	(93)
<i>Klebsiella aerogenes</i> (Ka)	Cepa silvestre (DBS0349838) ¹ , anteriormente llamada <i>Aerobacter aerogenes</i>	(94, 95)

2.2. Cepa de *Dictyostelium discoideum*

La cepa de *D. discoideum* utilizada en este trabajo corresponde a la cepa axénica AX4 (DBS0302402), obtenida por mutagénesis espontánea de la cepa parental AX3 (94, 95).

2.3. Medios de Cultivo

2.3.1. Medios de cultivo bacteriano

Todas las cepas bacterianas se mantuvieron y renovaron periódicamente en placas Petri con medio LB sólido, compuesto por medio Luria-Bertani (Difco™ LB Broth, Miller) y agar (Bacto™ Agar), al 1.5%. Y previo a los ensayos, se crecieron habitualmente en medio Luria-Bertani líquido, a 37°C, 180 rpm por 18 horas –cultivo de noche-. El medio fue suplementado con 50 µg/mL de tetraciclina para el crecimiento de los mutantes de *P. aeruginosa*.

Para los ensayos de virulencia bacteriana y la evaluación del efecto de las moléculas químicas contra la enzima PaPPK1, las células crecidas en el medio de cultivo fueron centrifugadas y lavadas 3 veces (8000 g por 5 min a temperatura ambiente) con medio PGS con alto fosfato (\uparrow Pi) [3 g/L NaCl (Merck), 2% glicerol (Merck), 2.5 g/L peptona (Bacto™ Peptone), CaCl₂ 1mM (Merck), MgSO₄·7H₂O 1mM (Merck), y Buffer K-Ph equivalente a 25mM de fosfato, y se ajustó a pH=6 con HCl]. Posteriormente, se crecieron en el medio PGS (\uparrow Pi), a 37°C, 180 rpm, por 18 horas.

La cepa control *Klebsiella aerogenes*, fue crecida en medio LB (37°C, 180 rpm por 18 horas), y posteriormente, el día del experimento, se lavó 3 veces con medio PGS (\uparrow Pi), con el fin de homogeneizar la suspensión bacteriana.

2.3.2. Medios de cultivo para la ameba *Dictyostelium discoideum*

La cepa utilizada en este estudio (AX4), se creció y mantuvo rutinariamente sobre un césped de *Klebsiella aerogenes* (crecida previamente en LB; 37°C, 180 rpm, 18 horas), en placas con agar SM (10 g/L glucosa [Merck], 1 g/L extracto de levadura [Bacto™ yeast extract], 10 g/L peptona de caseína [Merck], 1.08 g/L MgSO₄·7H₂O [Merck], 1.9 g/L KH₂PO₄ [Merck], 0.6 g/L K₂HPO₄ [Merck], 20 g/L agar [Bacto™ agar]; pH 6.5). El crecimiento de la ameba es observable en el día 3 post-incubación a 22°C por la presencia de placas de fagocitosis –zonas claras libres de bacterias-. Para los ensayos llevados a cabo en placas multipocillos, fue necesario crecer las células de *D. discoideum* de forma axénica (libre de bacterias) y mantenerlas en fase de crecimiento exponencial ($1-4 \times 10^6$ cél/mL), en medio líquido HL5 (14 g/L triptona [Bacto™ tryptone], 7 g/L extracto de levadura,

0.66 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [Merck], 1.2 g/L KH_2PO_4 , 14 g/L glucosa; pH 6.5), a 22°C, 180 rpm (96).

Con la finalidad de mantener cultivos axénicos saludables de la ameba, se realizó un cronograma de trabajo y un monitoreo periódico de su densidad celular mediante la utilización de un hemocitómetro (Neubauer improved; 0,100 mm de profundidad; 0.0025 mm² de superficie; Brand), para el sub-cultivo de las células cada dos días aproximadamente. Para realizar los conteos celulares y preparar las células de *D. discoideum* para los experimentos, se utilizó el colorante Trypan blue (Trypan blue stain 0.4%; Gibco) -en una proporción 1:1-, con el fin de contabilizar únicamente las células vivas, observables incoloras al microscopio óptico. Las células muertas se tiñen de azul por su coloración con el Trypan blue.

Es importante mencionar que, los resultados más reproducibles fueron obtenidos utilizando hasta el sub-cultivo número 4 de la ameba. Esto es conocido en la literatura, pues la ameba, luego de varios sub-cultivos axénicos, comienza una acumulación masiva de mutaciones espontáneas y recombinaciones genómicas que afectan la reproducibilidad de los experimentos en este modelo (96).

El crecimiento óptimo de *D. discoideum*, se observa a temperaturas entre los 21 a 23 grados Celsius; ya que a temperaturas superiores (sobre 25 °C), su crecimiento se ve fuertemente inhibido.

Cuando se cultivan células de *D. discoideum* en medio líquido, es esencial que permanezcan en fase exponencial de crecimiento, esto es, entre $1-4 \times 10^6$ células/mililitro, en vez de permitirles alcanzar la fase estacionaria, debido a que,

cultivos que alcanzan densidades celulares mayores, comienzan a secretar factores que desencadenan la entrada en el desarrollo social, cambiando de este modo la fisiología del cultivo. Sumado a ello, tampoco se deben diluir los cultivos a densidades inferiores de 1×10^4 células/mL, debido a que entran en una fase "lag" por un período muy variable. Es necesario también, renovar cada 2 a 4 semanas desde el stock de amebas/esporas congeladas, debido a que cultivos prolongados pueden conducir a la acumulación de mutaciones indeseadas antes señaladas (96).

2.3.3. Determinación de las condiciones óptimas para evaluar la virulencia bacteriana sobre el desarrollo social de *D. discoideum*

Con la finalidad de evaluar la virulencia frente a *D. discoideum* de los mutantes de *P. aeruginosa*, se llevaron a cabo diversos experimentos donde se ensayaron distintas condiciones, las que consistieron en: modificar la composición del medio de co-cultivo de la ameba con las bacterias en las placas multipocillos, empleando únicamente agar SM, ó SM-50% (5 g/L glucosa [Merck], 0.5 g/L extracto de levadura [Bacto™ yeast extract], 5 g/L peptona de caseína [Merck], 0.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [Merck], 1.1 g/L KH_2PO_4 [Merck], 0.5 g/L K_2HPO_4 [Merck], 20 g/L agar [Bacto™ agar]; pH 6.5); Agar N (1 g/L glucosa [Merck], 1 g/l peptona de caseína [Merck], 20 g/L agar [Bacto™ agar], en Buffer Soerensen 1X (50X: 49.93 g/L KH_2PO_4 [Merck], 8.9 g/L $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ [Merck], pH 6.0)); ó agar N como medio base, y sobre éste, añadir un volumen (250 μ L) de agar top N (agar N con 7.5 g/L agar [Bacto™ agar]). También se varió el número de células microbianas, tanto de la bacterias (*P. aeruginosa* y *K. aerogenes*) como de la ameba, o la



temperatura de incubación de las bacterias. Finalmente, se analizó la co-incubación de *P. aeruginosa* con distintas proporciones de *K. aerogenes*, y finalmente, el tiempo de observación del experimento. Teniendo en cuenta todos estos parámetros (Tabla 2) se pudieron establecer las condiciones óptimas para los ensayos.

Tabla 2. Condiciones evaluadas para los ensayos de virulencia bacteriana.

Condición	Descripción
a) Composición del medio de co-cultivo	-Agar SM -Agar SM-50% -Agar N -Agar N+agar top N
b) Concentración bacteriana	-Cultivo de noche directo (en PGS↑) -Cultivo crecido hasta DO 0.25, 0.5 (en PGS↑) -Cultivo de noche ajustado a DO: 0.25, 0.5 (en PGS↑)
c) Temperatura de incubación de las bacterias	22 °C, 37 °C (cultivo de noche o en fase de crecimiento)
d) Concentración de la ameba	10 ⁶ , 10 ⁵ , 10 ⁴ , 4000, 2000, 1000, 500, 250, 100, 10 y 3 células
e) Temperatura de incubación	22°, 25° Celsius
f) Composición del co-cultivo microbiano	- <i>P. aeruginosa</i> directo (100% PAO1) - <i>Klebsiella aerogenes</i> con: 3.5%, 5%, 10%, 17%, 25%, 50%, de <i>P. aeruginosa</i>
g) Tiempo de observación	15 días

2.3.4. Evaluación del efecto anti-virulencia de las moléculas diseñadas *in silico* contra la PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1

Las 32 posibles moléculas anti-virulencia diseñadas contra el sitio activo de la PaPPK1 utilizadas en este trabajo, fueron obtenidas previamente en nuestro laboratorio (Chávez *et al.*, 2011) (52). La efectividad de estos compuestos inhibidores, se evaluó en base al cumplimiento de los tres requisitos ya mencionados:

- 1) No inhibir el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* PAO1 (Test Antibiótico)
- 2) No afectar el crecimiento/desarrollo del hospedero (*D. discoideum*) ni a su bacteria comensal (*K. aerogenes*) denominada en este trabajo también como "bacteria beneficiosa" (Test de Efectos Secundarios)
- 3) Atenuar la virulencia de *P. aeruginosa* en el hospedero *D. discoideum* (Test Anti-virulencia).

Para verificar el cumplimiento de estos requisitos en las placas de 48 pocillos se realizaron ensayos simultáneos con las siguientes especificaciones para cada uno:

Ensayo Antibiótico: + *P. aeruginosa*
+ Compuesto NCI

Ensayo de Efectos Secundarios: + *K. aerogenes*
+ *D. discoideum*
+ Compuesto NCI

Ensayo Anti-virulencia: + *P. aeruginosa*
+ *K. aerogenes*
+ *D. discoideum*
+ Compuesto NCI

2.4. Evaluación de la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 en los experimentos de desarrollo social con *D. discoideum*

Los ensayos clásicos de infección realizados en *D. discoideum* con *P. aeruginosa*, se limitan a observar el crecimiento vegetativo, es decir, la formación de los halos de fagocitosis producto de la predación en las primeras etapas del crecimiento (59, 97). Sin embargo, nuestros experimentos fueron seguidos durante 10 días, lo que permitió observar completamente la influencia del patógeno en el desarrollo social de la ameba.

En nuestros experimentos, se registró tanto el tiempo que tardó la aparición de halos fagocíticos como el subsecuente desarrollo social de la ameba. Todo el análisis se hizo comparativamente, basándonos en el tiempo que demora el crecimiento vegetativo y el desarrollo social sobre la cepa control *K. aerogenes*. Para el registro de los datos, clasificamos el ciclo de vida de *D. discoideum* en tres estadios: **crecimiento vegetativo y agregación** (Estadio 1), que comprende desde la aparición de placas de fagocitosis hasta la agregación de las amebas individuales en un centro común (ambos estadios muy ligados y por ende, se agruparon en uno solo); **elevación** (Estadio 2), que va desde la formación del montículo, hasta el dedo y/o babosa; y por último, la **culminación** (Estadio 3), que abarca desde la formación del sombrero mexicano hasta la aparición del cuerpo fructífero maduro (Figura 3). Los experimentos fueron registrados en los días 4, 6, 8 y 10. El tiempo que tardó el crecimiento y el desarrollo de la ameba, permitió correlacionarlo con la virulencia de las cepas en estudio frente al modelo de infección utilizado.

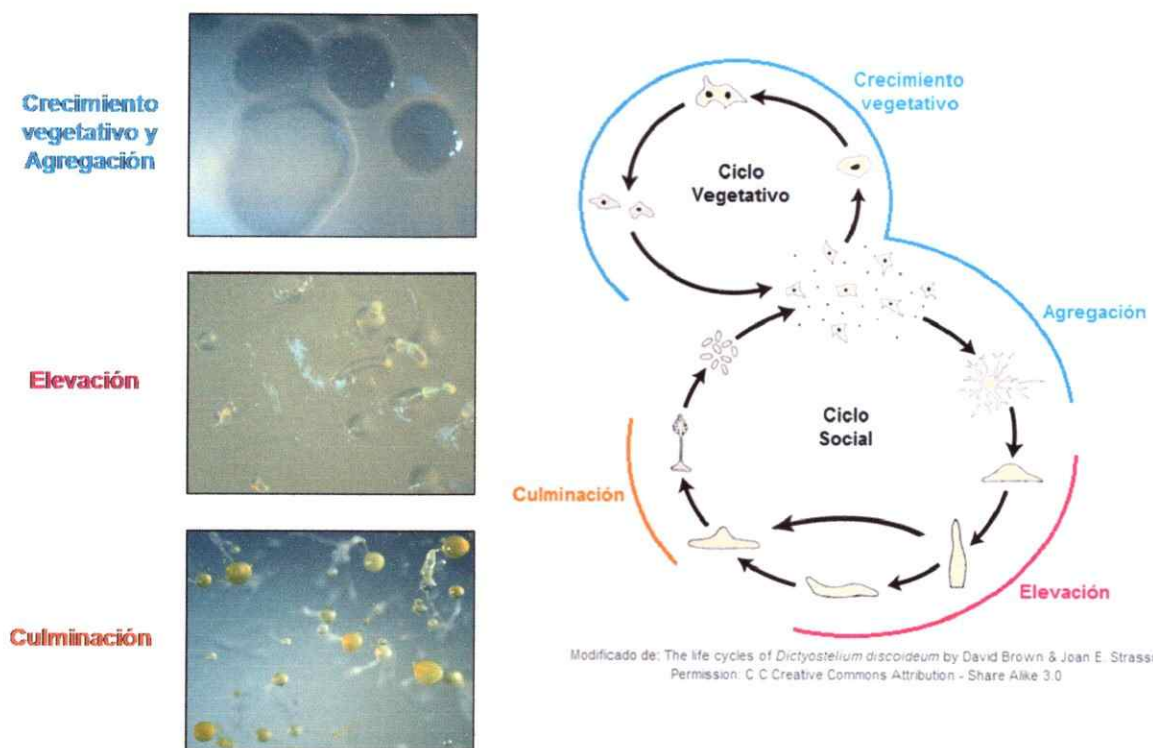


Figura 3. Estadios del ciclo de vida de la ameba *D. discoideum* observados en los experimentos. La figura delimita los tres estadios observados en los experimentos de desarrollo social con *D. discoideum*; las imágenes fueron capturadas durante los experimentos con un aumento de 1.25x (Olympus, Japón).

Luego del registro de los datos durante los días mencionados, los resultados obtenidos fueron graficados y analizados utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA); y se realizó el registro fotográfico en los días 8 y 10 mediante lupa (Olympus, Japón).

3. RESULTADOS

3.1. Desarrollo de un método a gran escala para evaluar la influencia de *P. aeruginosa* en el desarrollo social de *D. discoideum*

Los protocolos reportados en la literatura para el uso de *D. discoideum* en ensayos para evaluar la virulencia de *P. aeruginosa* son variados y solo abarcan la primera fase del crecimiento de *D. discoideum*, es decir, la predación o fagocitosis de la bacteria. En nuestro trabajo, desarrollamos un método que incluye la observación de la capacidad que ofrece la bacteria de ser fagocitada y también de permitir el resto de las fases del desarrollo, como la elevación y la culminación.

Para esto, realizamos varios experimentos evaluando una serie de condiciones (ver Tabla 2, Materiales y métodos), entre las que destacamos aquellas que fueron determinantes, como el medio de co-cultivo (agar) en las placas multipocillos y la composición del co-cultivo bacteriano (mezcla de *P. aeruginosa* más *K. aerogenes*). Para esto y como cepas control utilizamos la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1 (control positivo de virulencia), y el mutante de la comunicación bacteriana (*rhIR-*) que posee una virulencia atenuada en numerosos modelos incluidos *D. discoideum*. De esta forma, tanto el mutante *rhIR-* como *K. aerogenes* son permisivos para el desarrollo de la ameba, en contraste con la cepa silvestre de *P. aeruginosa* (15, 59, 96, 97). Cabe señalar que, simultáneamente a las condiciones mencionadas, se evaluó la densidad adecuada de la ameba realizando sucesivas diluciones de ésta en las placas multipocillos (24/48 pocillos).

Pudimos constatar que las mejores condiciones experimentales se obtuvieron utilizando agar N como medio de co-cultivo, debido a que es un medio poco nutritivo que no favorece el crecimiento bacteriano, evitando así la formación de exopolisacárido en la superficie del agar, característico de *P. aeruginosa* cuando crece sobre un medio muy nutritivo; y dos co-cultivos bacterianos compuestos por distintas proporciones de *P. aeruginosa* más *K. aerogenes* (25% de PAO + 75% de Ka y 50% de PAO + 50% de Ka) (Tabla 3) y 500 células de *D. discoideum*. Los resultados observados en el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* en las condiciones seleccionadas se muestran en la Figura 4.

Tabla 3. Crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* sobre las cepas control.

Medio de co-cultivo (agar)	100% PAO1		50% PAO1 ^(a)		25% PAO1 ^(a)		5% PAO1 ^(a)		<i>Klebsiella aerogenes</i>
	silvestre	<i>rhIR-</i>	silvestre	<i>rhIR-</i>	silvestre	<i>rhIR-</i>	silvestre	<i>rhIR-</i>	silvestre
SM	-	CV	-	CV	-	E	C	C	C
SM-50%	-	CV	-	E	-	E	C	C	C
N	-	CV	-	C	E	C	C	C	C

(a): La proporción restante de bacterias se completó con *Klebsiella aerogenes*.

Los resultados en el crecimiento/desarrollo de *D. discoideum* sobre las cepas, fueron observados en el día 10 de cada experimento. Se destacan las condiciones que resultaron óptimas.

(-): No hay crecimiento de *D. discoideum*, (CV): Crecim. vegetativo y agregación, (E): Elevación, (C): Culminación

Como se observa en la Figura 4, a diferencia de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1, las cepas control: *K. aerogenes* y el mutante *rhIR-* son permisivas para el desarrollo de la ameba en ambas condiciones (25% y 50% PAO1). Por su parte, cuando *Pseudomonas* silvestre fue añadida en una

proporción del 50% en el ensayo, el desarrollo de la ameba fue totalmente inhibido a diferencia de lo que se observa a 25% donde a los 10 días solo alcanza a la fase de elevación. Es de destacar que en nuestros ensayos, el mutante *rhIR-* se comportó igual que la cepa no virulenta *K. aerogenes*.

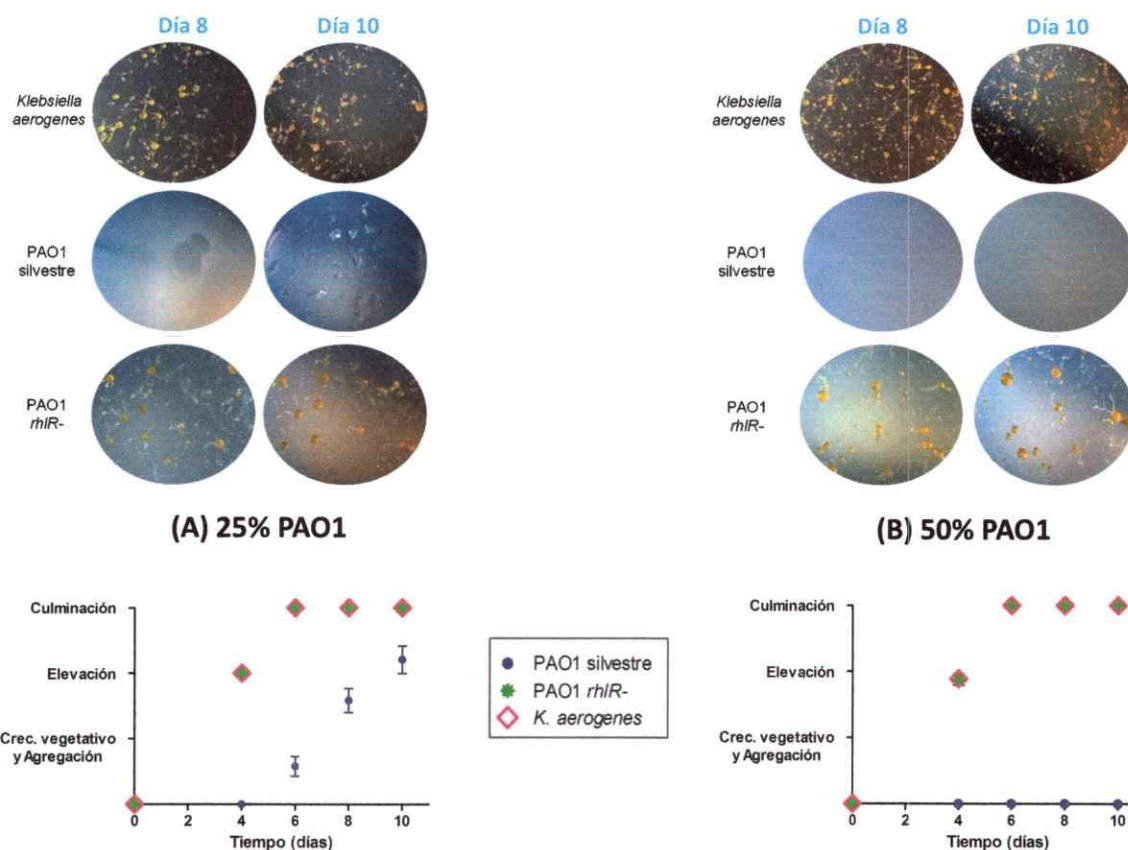


Figura 4. Crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* sobre co-cultivos con 25% y 50% de *P. aeruginosa* en placas con agar N.

En consecuencia, el protocolo llevado a cabo para evaluar el efecto de *P. aeruginosa* en el desarrollo social de *D. discoideum*, consistió esencialmente en cultivar los días previos al experimento, las distintas cepas de *P. aeruginosa* y *K. aerogenes* como se señaló previamente en Materiales y métodos, y el cultivo libre

de bacterias (axénico) de *D. discoideum* en fase exponencial de crecimiento. Luego, el día del montaje del ensayo, ambas suspensiones ya homogenizadas en medio PGS (\uparrow Pi), se ajustaron a DO_{600nm} : 0.5, se realizaron los co-cultivos bacterianos en las proporciones mencionadas (25% y 50% de *P. aeruginosa*); se depositó un volumen de cada mezcla (35 μ L) en las placas de 24 pocillos –que contenían previamente agar N + agar top N-. Se permitió el secado del volumen bacteriano añadido en la campana de bioseguridad (Thermo Scientific). Mientras tanto, se realizó el conteo de las células de *D. discoideum* y se realizó la dilución correspondiente (500 células/mL). Cuando el agar estuvo completamente seco (visible por su aspecto opaco), se inoculó el volumen de suspensión (10 μ L), que contenía las 500 células de *D. discoideum*. Finalmente, se permitió nuevamente el secado de la placa, y se incubó a 22°C; monitoreando los experimentos durante 10 días, clasificando en cada día de observación, el estadio en que se hallaba la ameba (Figura 5).

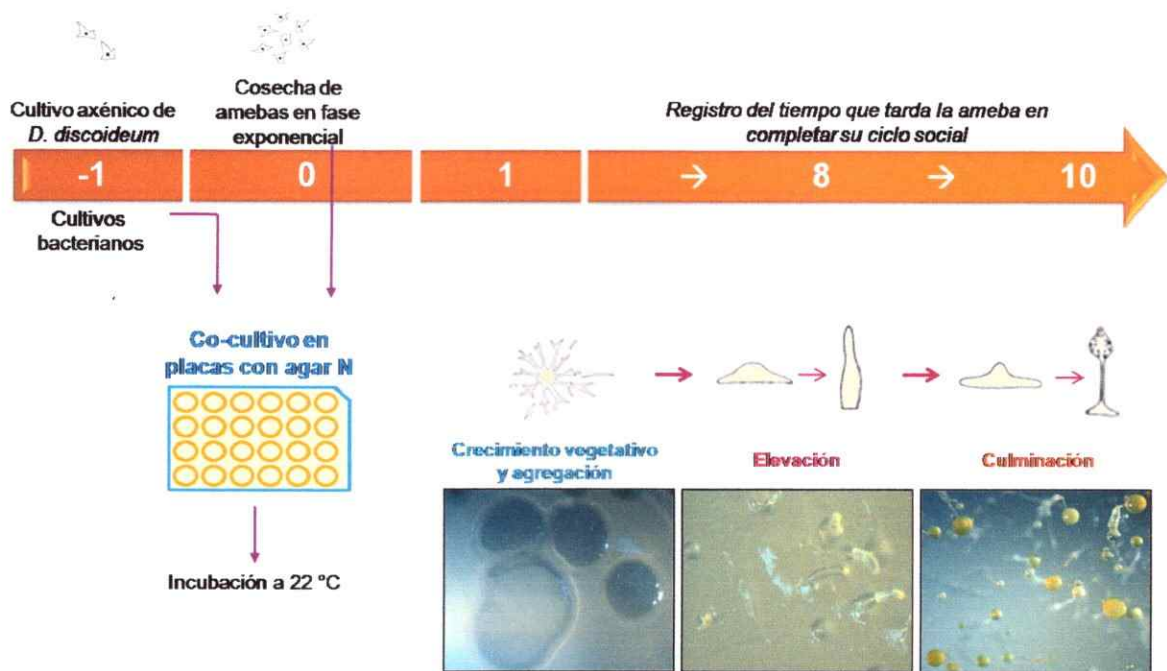


Figura 5. Protocolo experimental para evaluar el efecto de *P. aeruginosa* PAO1 en el desarrollo social de *D. discoideum*. La figura muestra el protocolo experimental desarrollado en este trabajo. Se adjuntan los tres estadios evaluados del ciclo social de la ameba.

3.2. Evaluación de la virulencia de mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 en *D. discoideum*

Con el fin de evaluar la virulencia de la cepa silvestre y diversos mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 relacionados con la expresión de factores de virulencia sobre *D. discoideum*, se llevaron a cabo los experimentos de virulencia en placa desarrollados previamente. Los ensayos se realizaron utilizando ambas proporciones de *P. aeruginosa* (25% y 50% PAO), con las cuales se pudo corroborar que la ameba, al enfrentarse a cepas virulentas de *P. aeruginosa*, su crecimiento y/o desarrollo se vio afectado.

Para todas las cepas analizadas, se determinaron las diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento y el desarrollo de *D. discoideum* entre la cepa silvestre versus los distintos mutantes en la expresión de factores de virulencia y el metabolismo de los poliP de *P. aeruginosa* PAO1, mediante un ANOVA de dos vías para medidas repetidas y un post-test de Bonferroni. En base a este análisis, se determinó que el crecimiento y desarrollo de la ameba se ve afectado diferencialmente por las distintas cepas de *P. aeruginosa* ($P < 0.0001$).

A continuación detallamos los resultados obtenidos con los diferentes mutantes analizados.

3.2.1. Crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* sobre mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en la síntesis de los poliP

Las deficiencias en la virulencia del mutante *ppk1*- han sido reportadas para diversas bacterias y en distintos modelos como se señaló en los antecedentes de este trabajo; sin embargo, poco o nada se conoce sobre fenotipo del mutante *ppk2*- de *P. aeruginosa*. Es por esta razón, que determinamos la virulencia de estos mutantes en el organismo modelo *D. discoideum*. Los resultados nos permitieron no solo corroborar que la ameba es capaz de fagocitar al mutante *ppk1*- sino también demostrar que permite la culminación del desarrollo social (25%) y la fase de elevación (50%) (Figura 6).

Según los resultados obtenidos, con un 25% de *P. aeruginosa*, se pudo corroborar que la cepa silvestre de *P. aeruginosa* (control positivo), es virulenta sobre *D. discoideum*, permitiéndole alcanzar sólo hasta la fase de elevación en el día 10. Según lo esperado, el mutante *ppk1*- presenta una virulencia atenuada

sobre la ameba, constatándose diferencias estadísticamente significativas respecto a la cepa silvestre en los días 6 ($P < 0.01$), 8 y 10 ($P < 0.001$) del desarrollo, día en el que se alcanza la fase de culminación. En contraste, el mutante *ppk2-* resultó ser más virulento que la cepa silvestre, ya que afecta significativamente el desarrollo en los tres últimos días de observación (6, 8 y 10), y donde la ameba únicamente alcanza la fase de crecimiento vegetativo y agregación en el día 10 ($P < 0.001$). Además, cuando se utilizó una proporción mayor de *Pseudomonas* (50%), aumentó significativamente la virulencia del mutante *ppk2-* y de la cepa silvestre, donde ninguna de estas cepas permitió el crecimiento ni el desarrollo de *D. discoideum*. Por su parte, el mutante *ppk1-*, sí permitió que la ameba alcanzara hasta la fase de elevación, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los tres últimos días de observación (6, 8 y 10) con $P < 0.001$ (Figura 6) (Figura suplementaria 1).

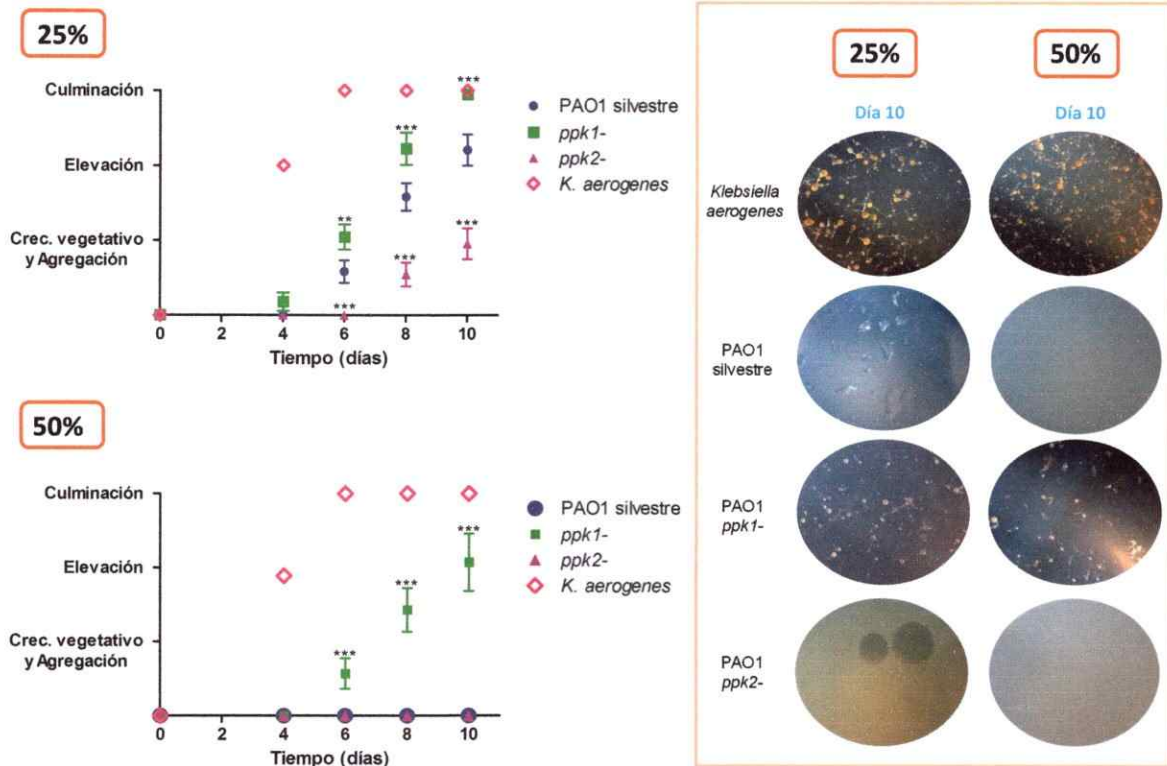


Figura 6. Crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* sobre mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en la síntesis de los polifosfatos. La figura corresponde a ambos co-cultivos bacterianos evaluados (25% y 50% PAO). Se determinó el estadio de crecimiento/ desarrollo de la ameba en los días 4, 6, 8 y 10. Se muestra el promedio de 5 experimentos independientes realizados en duplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni, comparando contra la cepa silvestre. [(**): $P < 0.01$; (***) : $P < 0.001$]. Para resultados en más detalle, ver Figura suplementaria 1.

3.2.2. Crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* sobre mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en la síntesis de los sideróforos (pioverdina y pioquelina) y del pigmento tóxico piocianina

Los sideróforos y el pigmento tóxico piocianina, son factores de virulencia que se han vinculado con la patogenicidad de *P. aeruginosa* frente a diferentes hospederos. Con el objetivo de determinar cuales factores de virulencia son determinantes en *Pseudomonas* para causar daño en *D. discoideum*, se realizaron ensayos de virulencia con los mutantes deficientes en la síntesis de los sideróforos pioverdina (*pvdF*-), pioquelina (*pchF*-); y mutantes de la síntesis del pigmento tóxico piocianina (*phzM*-, *phzS*-). Para esto, utilizamos las mismas proporciones de *P. aeruginosa* (25%, 50%) más *K. aerogenes* y registramos el desarrollo de la ameba descrito previamente (ver Figura 3).

En cuanto a los mutantes de sideróforos analizados, en los ensayos con un 25% de PAO, sólo el mutante *pvdF*- mostró diferencias significativas comparado con la cepa silvestre de *P. aeruginosa*. A diferencia de la cepa silvestre, en el día 8 la ameba fue capaz de alcanzar la fase de elevación ($P < 0.05$) y en el día 10 muy cercana a la culminación ($P < 0.01$). Por su parte, el mutante del sideróforo pioquelina (*pchF*-), no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a la cepa silvestre en los días observados, comportándose similar a esta última. Cuando se utilizó la proporción de 50% de *P. aeruginosa*, el mutante *pchF*- mantuvo el mismo comportamiento que la cepa silvestre, ambas cepas fueron muy virulentas para *D. discoideum*. En contraste, el mutante *pvdF*- tuvo diferencia estadísticamente significativa respecto a la cepa silvestre en el día 10 ($P < 0.05$),

pero la virulencia de éste, igualmente aumentó con respecto al experimento con sólo un 25% de *Pseudomonas* (Figura 7) (Figura suplementaria 2).

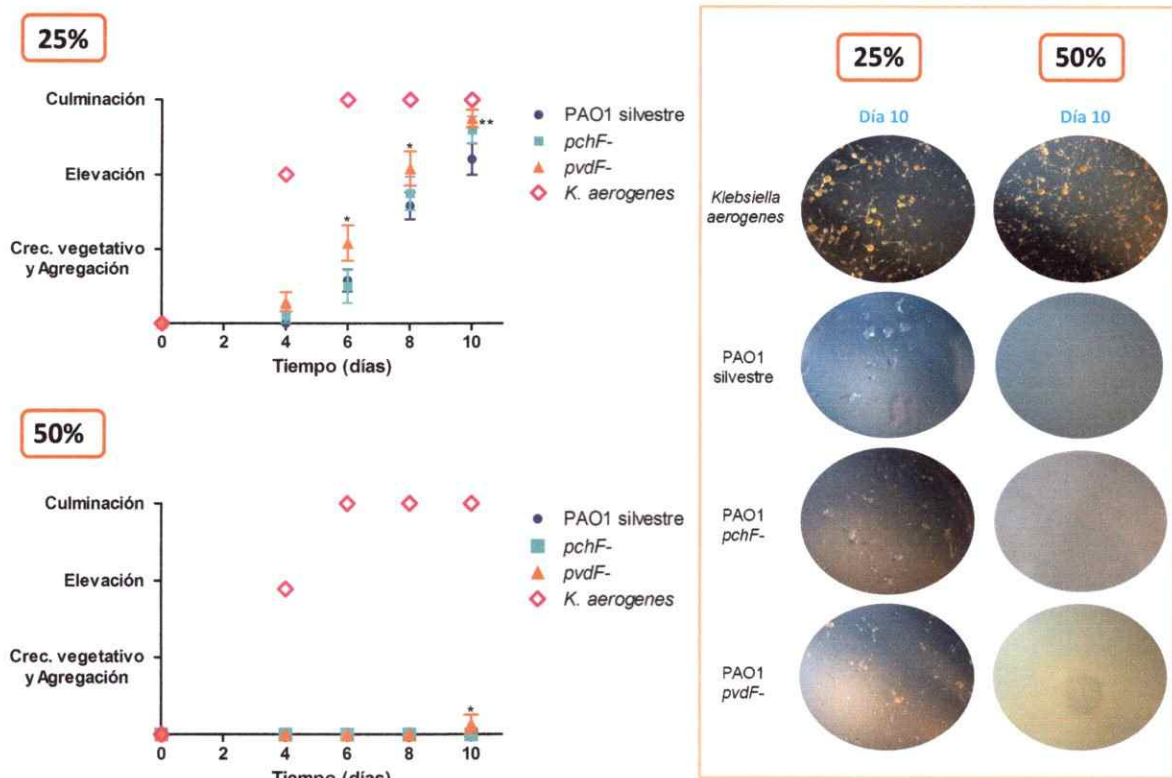


Figura 7. Crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* sobre mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en la síntesis de sideróforos (pioverdina y pioquelina). La figura corresponde a ambos co-cultivos bacterianos evaluados (25% y 50% PAO). Se determinó el estadio de crecimiento/desarrollo de la ameba en los días 4, 6, 8 y 10. Se muestra el promedio de 5 experimentos independientes realizados en duplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni, comparando contra la cepa silvestre. [(**): $P < 0.01$; (***) : $P < 0.001$]. Para resultados en más detalle, ver Figura suplementaria 2.

Finalmente, se llevaron a cabo los ensayos de virulencia con los mutantes de la síntesis del pigmento tóxico piocianina. En los experimentos con la proporción de 25% de *P. aeruginosa*, el mutante *phzS*⁻, tuvo diferencias significativas respecto a la cepa silvestre sólo en el día 8 ($P < 0.05$), ambas cepas permitieron el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* solo hasta la fase de elevación (día 10); y únicamente el mutante *phzM*⁻, difirió significativamente de la cepa silvestre, en los días 6, 8 y 10 ($P < 0.001$), siendo notablemente más virulento que esta última, y en donde la ameba fue incapaz de alcanzar la fase inicial de crecimiento (crecimiento vegetativo). Cuando se aumentó la proporción de *P. aeruginosa* al 50%, ninguno de los mutantes en estudio (*phzM*⁻, *phzS*⁻), mostró diferencias estadísticamente significativas comparado con la cepa silvestre, en cuanto al crecimiento y desarrollo de *D. discoideum*. Es decir, ni la cepa silvestre ni los mutantes permitieron el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* (Figura 8) (Figura suplementaria 3).

En resumen, de los pigmentos como factores de virulencia estudiados, al parecer solo la pioverdina sería esencial para causar daño en *D. discoideum*.

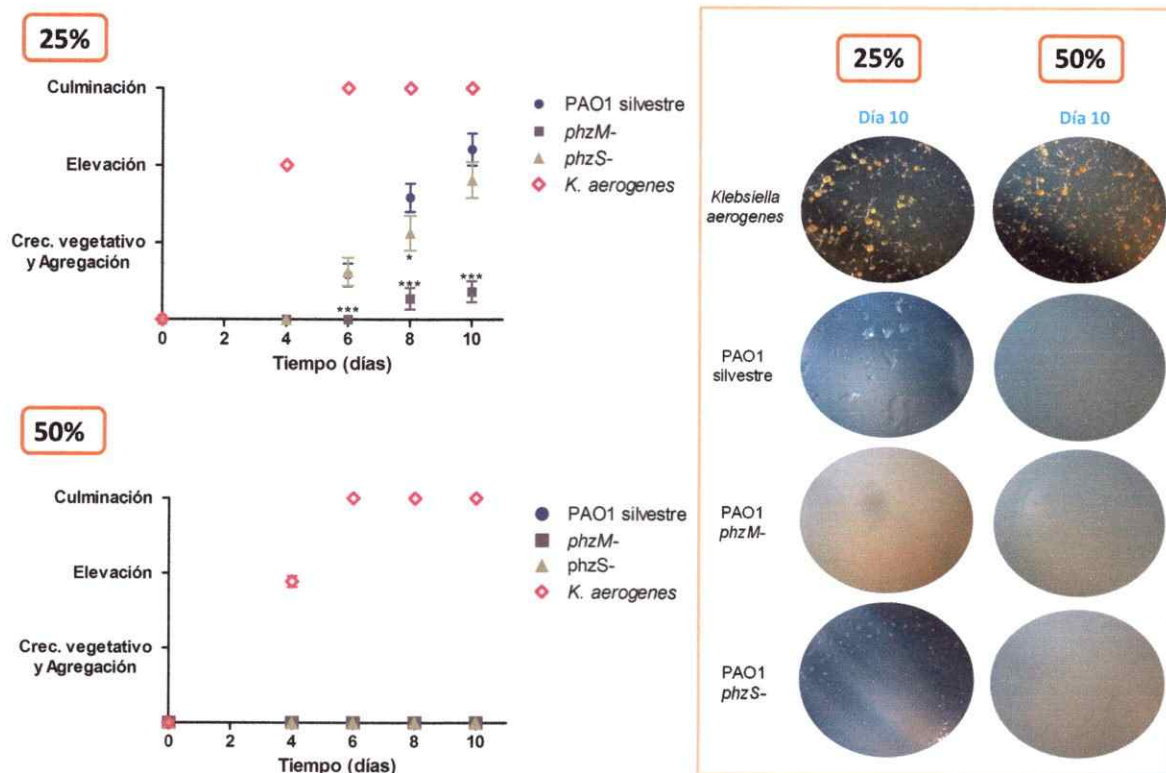


Figura 8. Crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* sobre mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en la síntesis del pigmento tóxico piocianina. La figura corresponde a ambos co-cultivos bacterianos evaluados (25% y 50% PAO). Se determinó el estadio de crecimiento/desarrollo de la ameba en los días 4, 6, 8 y 10. Se muestra el promedio de 5 experimentos independientes realizados en duplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni, comparando contra la cepa silvestre. [(**): $P < 0.01$; (***) : $P < 0.001$]. Para resultados en más detalle, ver Figura suplementaria 3.

3.3. Efecto anti-virulencia de moléculas químicas diseñadas *in silico* para inhibir la enzima PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1

Una vez diseñado y validado el protocolo para evaluar la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 en *D. discoideum* y comprobar el fenotipo de diferentes mutantes en factores de virulencia, establecimos las condiciones para evaluar el efecto sobre la cepa silvestre de *P. aeruginosa*, de las moléculas diseñadas previamente en el laboratorio que pudieran tener la capacidad de inhibir la virulencia de esta cepa hacia la ameba. Para esto, se utilizó el co-cultivo bacteriano correspondiente a 50% de *P. aeruginosa* (más 50% de *K. aerogenes*) preparado como se describió anteriormente. Un volumen de este co-cultivo de bacterias fue depositado en diversos tubos (quedando a una DO_{600nm} final de 0.3), añadiéndole a cada uno, 150 células de *D. discoideum* (axénicas y en fase exponencial de crecimiento) y cada uno de los compuestos anti-virulencia, quedando éstos, a una concentración final de 10 μ M en cada tubo. Esta suspensión, fue mezclada por vórtex, y pre-incubada a 22°C, por 1 hora, con agitación rotatoria a 20 rpm, modo F6 (BiotechQuest, USA). Transcurrido ese tiempo, se depositó un volumen (15 μ L) de cada suspensión en placas de 48 pocillos que contenían previamente agar N, y luego del secado se incubó a 22°C por 10 días; durante los cuales fue periódicamente monitoreado el experimento (ver Figura 5).

Con el objetivo de determinar el efecto anti-virulencia de las 32 moléculas seleccionadas, se realizaron ensayos que permitieron evaluar la acción de la molécula contra el patógeno, y la toxicidad de la misma hacia el hospedero. En la

Figura 9 se ilustran los ensayos realizados con *D. discoideum* para evaluar el cumplimiento de los requisitos por los 32 compuestos adquiridos desde el National Cancer Institute (NCI).

La selección de los compuestos anti-virulencia se basó en los tres criterios mencionados previamente, en cuanto a que no deben inhibir el crecimiento de *P. aeruginosa* (Test antibiótico); no deben interferir con el crecimiento y desarrollo normal de *D. discoideum* sobre *K. aerogenes* (Test de efectos secundarios), y además, deben atenuar la virulencia de *P. aeruginosa*, permitiendo que la ameba social crezca y se desarrolle sobre la cepa silvestre en la proporción de 50% de *P. aeruginosa*, donde como se demostró en el ensayo anterior, *D. discoideum* no fue capaz de crecer ni desarrollarse (Test anti-virulencia). De acuerdo a esto, en el presente estudio se evaluó la efectividad en atenuar la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 silvestre y los efectos secundarios, de 32 moléculas diseñadas *in silico* contra la enzima PPK1; empleando como hospedero la ameba social *Dictyostelium discoideum*, y como bacteria beneficiosa la cepa *Klebsiella aerogenes*. En este estudio se muestran los resultados de los 14 mejores compuestos identificados.

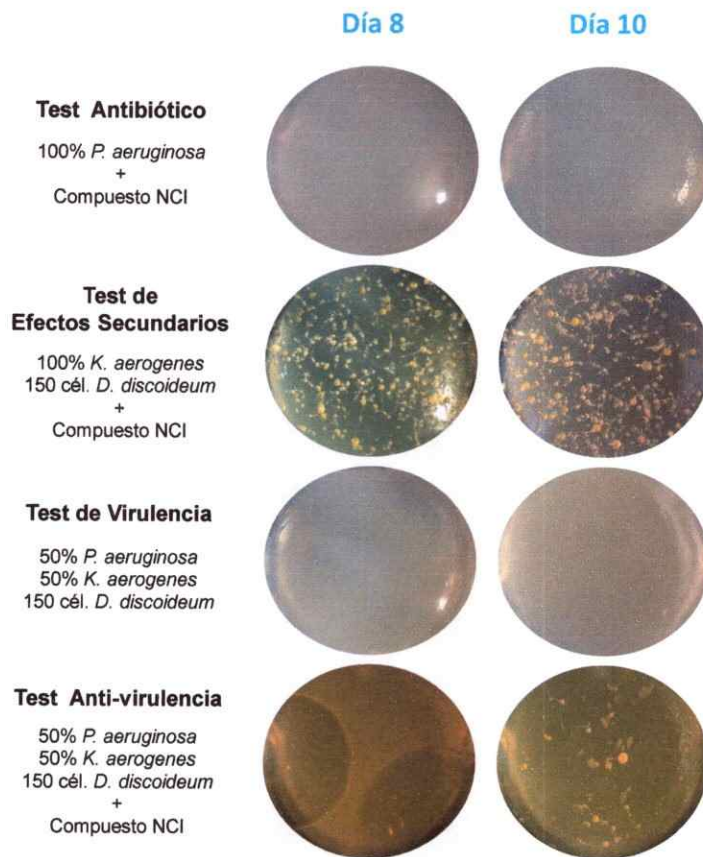


Figura 9. Requisitos que deben cumplir los compuestos anti-virulencia que tienen como blanco la enzima PPK1 de *P. aeruginosa* PAO1, evaluados en placa. Las imágenes corresponden a los días 8 y 10 de observación de los experimentos y fueron capturadas con un aumento de 0.63x (Olympus, Japón).

Para analizar las diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum*, realizamos un ANOVA de dos vías para medidas repetidas y un post-test de Bonferroni. El análisis para evaluar el efecto anti-virulencia, se efectuó entre el control de virulencia con la cepa silvestre (proporción 50% PAO1 + 50% *K. aerogenes* + *D. discoideum*), donde no hay crecimiento ni desarrollo de la ameba, versus esta mezcla en presencia de cada compuesto (50% PAO1 + 50% *K. aerogenes* + *D. discoideum* + Compuesto NCI).

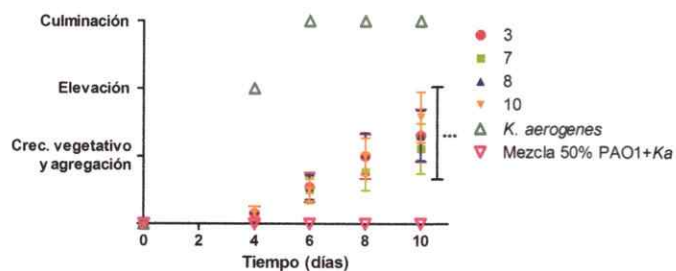
Por su parte, en el ensayo para evaluar los efectos secundarios, se determinaron las diferencias estadísticamente significativas en el crecimiento y desarrollo de la ameba sobre un césped de *K. aerogenes*, cuando ambos, hospedero y bacteria beneficiosa son expuestos a cada compuesto; este análisis se llevó a cabo comparando el control de crecimiento y desarrollo normal de la ameba (*K. aerogenes* + *D. discoideum*), versus el co-cultivo en presencia de cada inhibidor (*K. aerogenes* + *D. discoideum* + Compuesto NCI).

Es importante señalar que, en base al análisis estadístico realizado, el crecimiento y desarrollo de la ameba en las condiciones ensayadas, se ve influenciado por la presencia de los distintos compuestos y por el tiempo durante el cual se vea expuesto a éstos ($P < 0.0001$).

Respecto a los resultados obtenidos en el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* en el Test anti-virulencia, 14 de los 32 compuestos afectaron la virulencia de la cepa silvestre de *P. aeruginosa*, permitiendo que la ameba alcanzara la fase de crecimiento vegetativo y agregación en el día 8 de observación del experimento; no obstante, en el día 10 fue posible apreciar diferencias entre éstos. Es importante destacar, que ninguno de los 14 compuestos con actividad anti-virulencia presentados en este trabajo, tuvo efecto antibiótico, ni tampoco efectos secundarios ya sea sobre la bacteria beneficiosa (*K. aerogenes*) o sobre el hospedero (*D. discoideum*), permitiendo en el día 6, que *D. discoideum* alcanzara la fase de culminación; cumpliendo de este modo, con los tres requisitos previamente mencionados. Los resultados se agruparon según el estadio que alcanzó la ameba en el día 10 (crecim. vegetativo y agregación; elevación, ó culminación); de este modo, los compuestos 3, 7, 8, y 10 permitieron

que *D. discoideum* alcance la fase de crecimiento vegetativo y agregación (Figura 10) (Figura suplementaria 4 y Figura suplementaria 8).

(A) Test Anti-virulencia



(B) Test Efectos secundarios

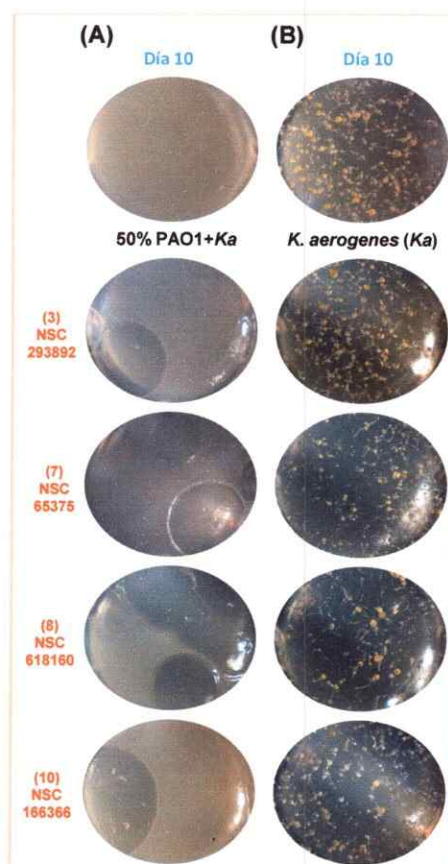
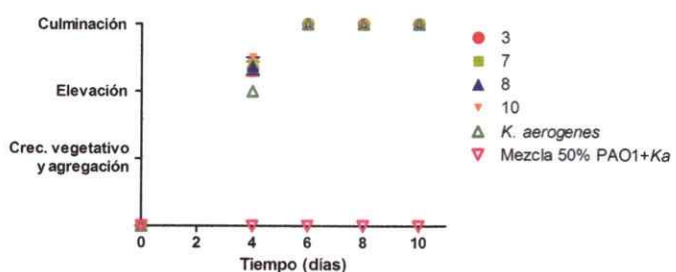
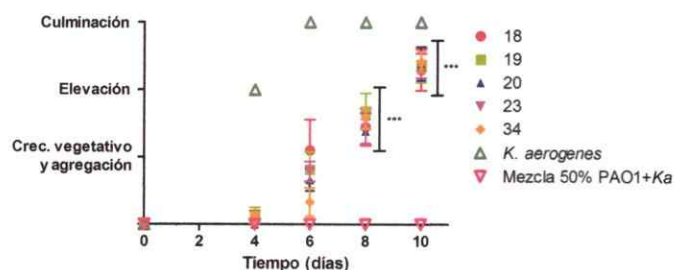


Figura 10. Efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus Efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. La figura corresponde al Test anti-virulencia (A) y al Test de efectos secundarios (B). Se evaluó el efecto de cada compuesto en ambos test (A, B). Se muestra el promedio de cuatro réplicas biológicas realizadas en triplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni. [(***): $P < 0.001$]. Para resultados en más detalle, ver Figuras suplementarias.

Por su parte, los compuestos 18, 19, 20, 23 y 34, tampoco tuvieron efectos secundarios y tuvieron diferencias estadísticamente significativas (respecto al control de virulencia) en el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* en los días 8

($P < 0.001$) y día 10 donde la ameba alcanzó la fase de elevación ($P < 0.001$) (Figura 11) (Figura suplementaria 5 y Figura suplementaria 9).

(A) Test Anti-virulencia



(B) Test Efectos secundarios

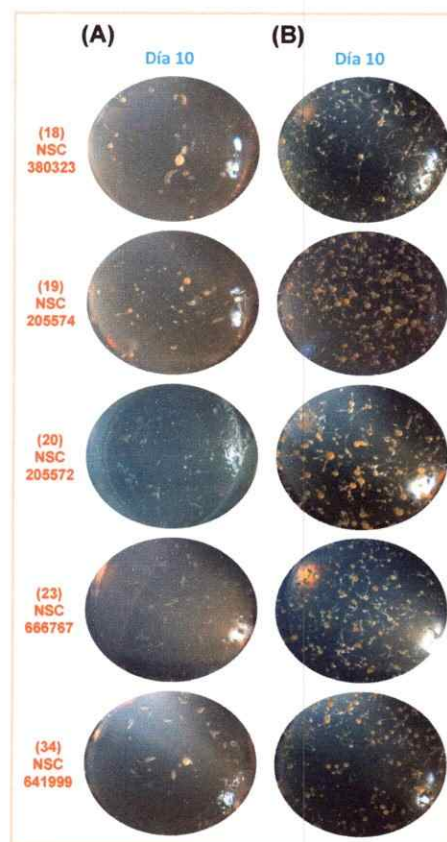
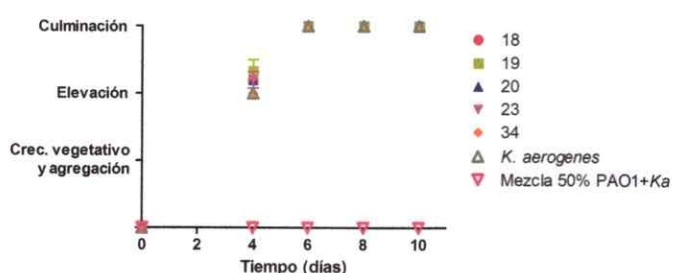


Figura 11. Efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus Efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. La figura corresponde al Test anti-virulencia (A) y al Test de efectos secundarios (B). Se evaluó el efecto de cada compuesto en ambos test (A, B). Se muestra el promedio de cuatro réplicas biológicas realizadas en triplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni. [(***): $P < 0.001$]. Para resultados en más detalle, ver Figuras suplementarias.

Por último, cinco de los 14 compuestos permitieron que la ameba alcanzara la fase de culminación –o muy cercana a ésta-, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al control de virulencia en los días 8 y 10 ($P < 0.001$). Estos corresponden a los compuestos número 24, 25, 27, 28 y 37

(Figura 12) (Figura suplementaria 6, Figura suplementaria 7 y Figura suplementaria 10).

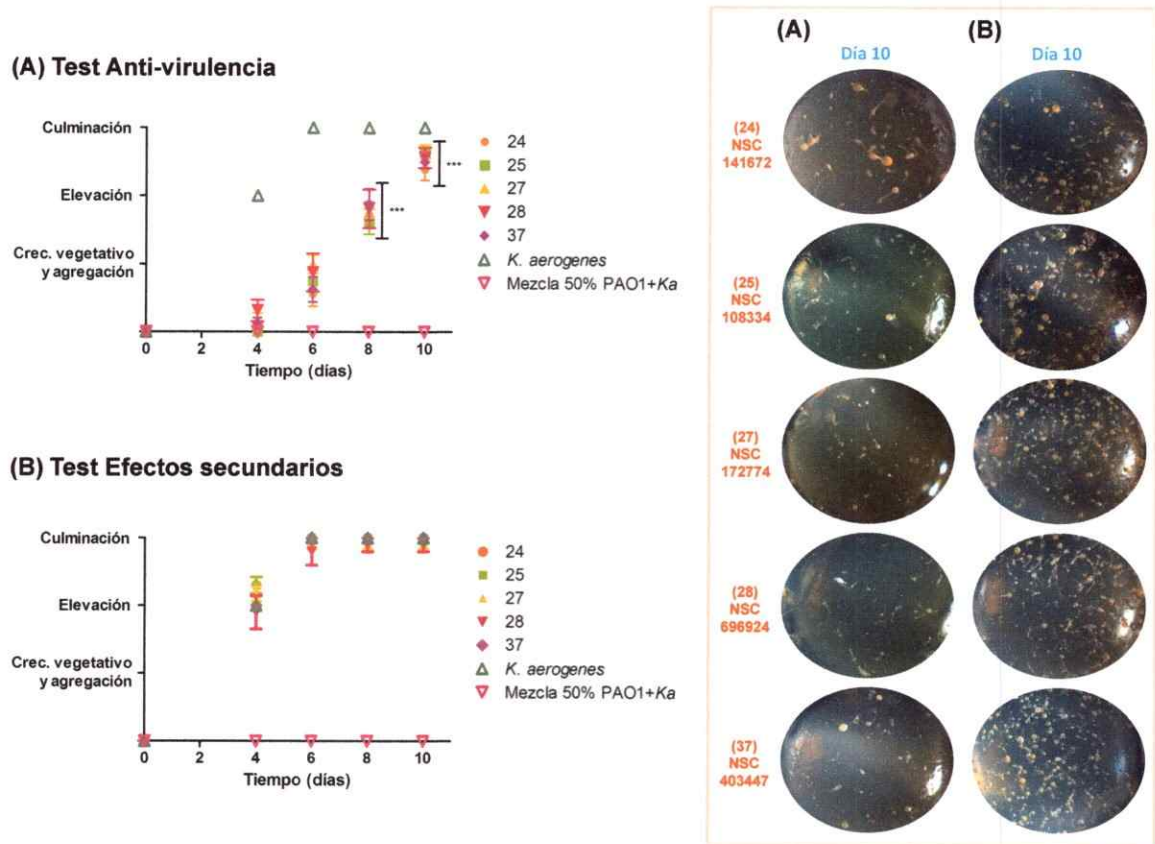


Figura 12. Efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus Efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. La figura corresponde al Test anti-virulencia (A) y al Test de efectos secundarios (B). Se evaluó el efecto de cada compuesto en ambos test (A, B). Se muestra el promedio de cuatro réplicas biológicas realizadas en triplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni. [(***): $P < 0.001$]. Para resultados en más detalle, ver Figuras suplementarias.

En síntesis, mediante los ensayos realizados simultáneamente con los 32 compuestos adquiridos previamente desde el NCI, se comprobó que 14 de ellos cumplen con los requisitos previamente establecidos para un compuesto anti-virulencia exitoso. Un resumen de los resultados obtenidos en todos los ensayos llevados a cabo para los 14 compuestos que resultaron positivos, se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos con los 14 compuestos inhibidores en cuanto a su efecto antibiótico, anti-virulencia, y efectos secundarios en el modelo *D. discoideum*.

No.	ID Compuesto ^[a]	Efecto Antibiótico ^[b]	Efecto Antivirulencia ^[c]	Efectos Secundarios ^[d]
3	293892	-	CV	-
7	65375	-	CV	-
8	618160	-	CV	-
10	166366	-	CV	-
18	380323	-	E	-
19	205574	-	E	-
20	205572	-	E	-
23	666767	-	E	-
24	141672	-	C	-
25	108334	-	C	-
27	172774	-	C	-
28	696924	-	C	-
34	641999	-	E	-
37	403447	-	C	-

[a] Código de cada compuesto (NSC).

[b] Efecto antibiótico de cada compuesto: (-): permite el crecimiento bacteriano; (+): no permite el crecimiento bacteriano

[c] Efecto anti-virulencia de cada compuesto, según el estadio del desarrollo social alcanzado por *D. discoideum* en el día 10: (CV): Crecimiento vegetativo y agregación; (E): Elevación; (C): Culminación.

[d] Efecto de cada compuesto sobre la ameba (hospedero) y/o sobre la cepa beneficiosa *K. aerogenes*: (+): genera efectos secundarios; (-): no genera efectos secundarios

4. DISCUSION



4.1. *Dictyostelium discoideum* como modelo hospedero-patógeno para evaluar la virulencia bacteriana

La alta reproducibilidad de los resultados, sumado a las ventajas propias de este modelo –mencionadas anteriormente– para el estudio de la virulencia de cepas patógenas y la identificación de nuevos factores de virulencia especialmente de *P. aeruginosa*, fueron un factor clave para utilizar la ameba *D. discoideum* como un modelo biológico para llevar a cabo esta investigación.

Considerando que la virulencia bacteriana depende de la interacción entre el hospedero y la bacteria (98); por ejemplo en *P. aeruginosa* PAO1, es conocido que si la bacteria crece en carencia de fosfato (Pi) es mucho más virulenta, pues aumenta la expresión de factores de virulencia como pigmentos tóxicos y sideróforos (99); es que se realizaron los ensayos para establecer las condiciones de crecimiento óptimas teniendo en cuenta los ensayos de virulencia (15, 18, 19, 59, 87, 97, 100).

Inicialmente, ajustamos las condiciones experimentales para el crecimiento de *D. discoideum* para evaluar la virulencia bacteriana de especies y cepas distintas, que crecen a diferentes temperaturas y velocidades. Emplear una alta dosis infectiva, así como utilizar un medio demasiado nutritivo, favorece el crecimiento bacteriano y por ende, al patógeno; lo que dificulta la evaluación de los resultados; además, es necesario evaluar la virulencia de variantes no patogénicas de la misma cepa bacteriana para hallar las condiciones apropiadas

donde la atenuación de la virulencia sea evidente (59). Esto es posible ilustrarlo con el análisis de la virulencia de *Aeromonas hydrophila*, que cuando es co-cultivada con *D. discoideum* en agar SM (medio muy nutritivo), este último es incapaz de crecer sobre la cepa silvestre y sobre mutantes no virulentas. La situación cambia cuando se utiliza un medio más diluido –menos nutritivo- donde *D. discoideum* sigue incapaz de crecer sobre la cepa silvestre de *A. hydrophila*, pero fagocita eficientemente las mutantes no virulentas (101).

Con la finalidad de establecer el protocolo adecuado, que permitiera evaluar la virulencia de las cepas de *P. aeruginosa* de interés para este trabajo, realizamos experimentos de virulencia con distintos mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 modificando diferentes condiciones experimentales, siendo dos de ellas clave (composición del agar de co-cultivo y composición del co-cultivo bacteriano). Finalmente, y en base a los resultados obtenidos, se utilizó agar N como sustrato para los ensayos virulencia –no el ya reportado agar SM, muy nutritivo-, y mezclas con distintas proporciones de *P. aeruginosa* con *K. aerogenes*, debido a que la ameba mostró dificultades para fagocitar cepas de *P. aeruginosa* cuando ésta era su única fuente de alimento, inclusive con el mutante avirulento utilizado como control negativo de virulencia en este trabajo (*rhIR-*). De varias proporciones utilizadas, 25% y 50% de *P. aeruginosa* (más *K. aerogenes*), nos permitieron evaluar la virulencia diferencial de los mutantes en estudio. La diferencia radicó en que al ensayar con la proporción de 50%, la ameba mostró mayor dificultad para fagocitar las cepas –por la mayor dosis infectiva-, pero las diferencias en la virulencia de los mutantes respecto a la cepa silvestre se mantuvo.

Cabe señalar que, todos los experimentos de infección que se han realizado en *D. discoideum* con *P. aeruginosa* se han limitado a verificar la capacidad de fagocitar la bacteria por parte de la ameba. Nuestros resultados no se limitan a analizar el crecimiento vegetativo únicamente, sino que también el desarrollo social de la ameba, de este modo pudimos clasificar el grado de virulencia de las cepas de acuerdo a los tres estadios considerados.

En los ensayos para la evaluación del efecto de los compuestos anti-virulencia, se empleó únicamente la proporción de 50% de *P. aeruginosa* (más 50% de *K. aerogenes*); debido a que la ameba fue incapaz de fagocitar la cepa silvestre cuando esta última estaba en tal proporción. De este modo, la aparición de placas de fagocitosis y el subsecuente desarrollo de la ameba, da cuenta de la efectividad de las moléculas en atenuar o disminuir la virulencia de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1.

Aunque la presencia de *K. aerogenes* (25% - 50%), asegura que exista una disponibilidad de alimento adecuado para *D. discoideum* en los ensayos, también hace que los resultados sean complejos de interpretar (15). Esto porque, las células de *P. aeruginosa* podrían inhibir directamente el crecimiento y desarrollo de la ameba; o de manera indirecta, que afectaran el crecimiento de *K. aerogenes* y en consecuencia, el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum*. Sin embargo, se pudo comprobar, que si se suministraba sólo *P. aeruginosa*, la ameba era incapaz de crecer y desarrollarse inclusive sobre el mutante atenuado *rhIR-*. Además, con ambos co-cultivos de *P. aeruginosa* + *K. aerogenes* (25% PAO y 50% PAO), se pudo constatar la virulencia diferencial de las cepas (15, 100, 102); especialmente

con el mutante *ppk1-*, quien fue el más permisivo para *D. discoideum*. Por su parte, en el ensayo con las moléculas anti-virulencia, pese a que se utilizó la proporción del 50% de *P. aeruginosa*, donde *D. discoideum* es incapaz de crecer; todos los compuestos presentados en este trabajo, permitieron que la ameba creciera y se desarrollara, por lo que es posible descartar que la inhibición del crecimiento vista anteriormente haya sido a causa de que *P. aeruginosa* interviniera de manera indirecta con el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* al afectar a la cepa beneficiosa *K. aerogenes*. Por el mismo motivo, es que realizamos un ensayo de efectos secundarios.

En este trabajo se utilizaron células axénicas de *D. discoideum* en fase vegetativa de crecimiento (crecimiento exponencial), ya que el potencial de fagocitar bacterias y otras partículas disminuye gradualmente cuando las células se encuentran en la fase multicelular (ciclo social) (103), por lo tanto, queda descartado también, que existieran limitantes en la ameba para fagocitar eficientemente las distintas cepas bacterianas estudiadas.

En consecuencia, considerando el gran potencial como modelo hospedero-patógeno de *D. discoideum* para evaluar la virulencia bacteriana, y habiendo establecido las condiciones experimentales óptimas, fue posible analizar a gran escala la virulencia de los distintos mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en la producción de factores de virulencia conocidos de esta bacteria.

Con respecto a los mutantes de los sideróforos pioquelina (*pchF-*) y pioverdina (*pvdF-*); la virulencia mostrada hacia *D. discoideum* por el mutante *pchF-* en la proporción con 25% de *P. aeruginosa*, no fue significativamente diferente a la cepa silvestre (alcanzando la fase de elevación en el día 10). No

obstante, la mutante del sideróforo pioverdina (*pvdF*-), resultó ser más permisivo para el crecimiento de la ameba (cerca a la fase de culminación en el día 10), que la cepa silvestre y que su contraparte *pchF*-. Al aumentar la proporción de *P. aeruginosa* al 50%, tanto la cepa silvestre como el mutante de pioquelina (*pchF*-), no permitieron el crecimiento de la ameba; sin embargo, pese a que la virulencia del mutante *pvdF*- también aumentó, éste continuó siendo más permisivo para el crecimiento de la ameba que el otro mutante de sideróforo. Estos resultados concuerdan con ensayos de virulencia llevados a cabo en el modelo de infección por inmersión con el pez cebra (*Danio rerio*) (92). En estos experimentos, la virulencia de las cepas también se incrementó al aumentar la carga bacteriana a la que se sometieron los peces (DO_{600nm} : 0,525 y DO_{600nm} : 0,7), lo que equivale a la proporción del 50% de *P. aeruginosa* aplicado en este estudio.

El sideróforo pioverdina, se considera un importante factor de virulencia en *P. aeruginosa*, que además regula la producción de otros factores de virulencia (21, 23, 24), cuya influencia en ésta ha sido evaluada frente a hospederos como el pez cebra (*Danio rerio*) y *C. elegans* (23, 91, 92, 99), donde mutantes virulentos de *P. aeruginosa*, han mostrado una alta producción de este sideróforo. Y en contraste, mutantes de pioverdina (*pvdF*-), presentan niveles reducidos del sideróforo (92, 104), y en consecuencia, son atenuados en su virulencia cuando son inyectados en el modelo de infección de ratón quemado y en larvas de *Galleria mellonella* (105, 106). Curiosamente, y debido a la relevancia del sideróforo pioverdina en la virulencia de *P. aeruginosa* (105), trabajos recientes proponen como estrategia anti-virulencia, el diseño de compuestos que inhiban su síntesis (21, 107-109).

Por otro lado, se ha visto un aumento de las sintetetasas de pioquelina (*pchEF*) en cepas virulentas de *P. aeruginosa* (18). Sin embargo, experimentos llevados a cabo con *D. discoideum*, revelan una ligera atenuación en la virulencia del mutante de *P. aeruginosa pchF-*, siendo parcialmente permisivo para la ameba respecto a la cepa silvestre (18, 97); similares resultados se obtuvieron con otros modelos como *Drosophila* y murino (18). Lo anterior, concuerda con lo mostrado en este estudio, y otro llevado a cabo en el pez cebra (92), donde la atenuación de la virulencia fue mayor en el mutante *pvdF-*, quien resultó ser más permisivo que la cepa silvestre y que su contraparte *pchF-* para el crecimiento y desarrollo de la ameba, ya que en este último, los niveles de pioquelina disminuyeron, pero la producción de pioverdina fue similar a la detectada en la cepa silvestre. Se corrobora de esta manera, el rol principal del sideróforo pioverdina, no así de la pioquelina, en la virulencia de *P. aeruginosa in vivo* (16, 21, 23, 110) en este modelo de estudio.

Por su parte, con los mutantes del pigmento tóxico piocianina (*phzM-*, *phzS-*), fue posible constatar que el mutante más virulento –inclusive que la cepa silvestre– fue *phzM-*, quien dificultó en gran medida el crecimiento de la ameba (día 10); mientras que el mutante *phzS-*, se comportó de manera similar a la cepa silvestre (en ambas proporciones de *P. aeruginosa*). No obstante, este comportamiento se homogeniza al aumentar la proporción de *P. aeruginosa* a 50%, donde todas las cepas, incluyendo la cepa silvestre, no permitieron el crecimiento ni el desarrollo de *D. discoideum*. Similares resultados se obtuvieron para el mutante *phzM-* en el modelo de infección con *Danio rerio* (92), y sólo hubo diferencias con el mutante *phzS-* que fue letal al igual que *phzM-* para el pez.

Este pigmento, también es considerado un factor de virulencia en infecciones generadas por *P. aeruginosa*; siendo vinculado a la muerte del nematodo *C. elegans* (3, 22), microorganismos (111), *Arabidopsis thaliana* (112) y *Galleria mellonella* (5). No obstante, la letalidad por sí sola de este pigmento, depende del hospedero, ya que actuaría de forma sinérgica con otros factores de virulencia de *P. aeruginosa* para causar infección, ó al estar ausente, otros factores serían los responsables de la virulencia de las cepas, o la virulencia se atribuiría a la acumulación de fenazinas intermediarias. Esto fue constatado en estudios llevados a cabo con el gusano de seda *Bombyx mori* (113), donde la inactivación de los genes de síntesis de piocianina (*phzM*, *phzS*), no atenuó la virulencia de estos mutantes hacia *Bombyx mori*, pese a que en ambos, no se detectó producción del pigmento (114); o si está presente, no es significativamente diferente a la cepa silvestre (92).

Por último, experimentos llevados a cabo con *D. discoideum*, revelan que la adición de piocianina pura a células creciendo axénicamente en medio líquido, no afectó la viabilidad de la ameba (19), sugiriendo la presencia de otros factores de virulencia de *P. aeruginosa* responsables de la virulencia observada en este modelo.

Finalmente, para los mutantes del metabolismo de la síntesis de los polifosfatos (poliP), los resultados obtenidos son contrastantes; el mutante *ppk1-*, mostró una virulencia atenuada en *D. discoideum*, siendo el más permisivo de todos los mutantes analizados en este estudio, en ambas proporciones de *P. aeruginosa* (25% y 50%), permitiendo que la ameba alcanzara la fase de culminación (25%, día 10); ó la fase de elevación (50%, día 10). Lo anterior,

concuerta con la virulencia atenuada de este mutante (*ppk1*-) de *P. aeruginosa* constatada en modelo de ratón quemado y ocular de ratón (12, 43), en *Caenorhabditis elegans* (91) y en *D. discoideum* (38, 97).

Curiosamente, el mutante *ppk2*-, resultó ser más virulento que el mutante *ppk1*- y que la cepa silvestre, interfiriendo con el crecimiento e impidiendo el desarrollo de la ameba. Cuando se aumentó la proporción a 50% de *P. aeruginosa*, la virulencia tanto de la cepa silvestre como del mutante *ppk2*-, aumentó al 100%, donde la ameba fue incapaz de crecer; lo cual fue visible por la presencia únicamente del césped bacteriano. Estos resultados, ratifican lo observado previamente en el modelo de infección con el pez cebra (*Danio rerio*), donde el mutante *ppk2*-, resultó ser muy virulento para el pez, debido a la alta producción de factores de virulencia como pioverdina y pioquelina, comparado con la cepa silvestre (23). En contraste, *ppk1*- presentó reducidos niveles del sideróforo pioverdina (23, 92), lo cual concuerda con la virulencia atenuada del mutante *pvdF*- tanto en el pez cebra (92) como en *D. discoideum*.

4.2. *Dictyostelium discoideum* como modelo para evaluar la efectividad de moléculas anti-virulencia bacteriana

Con la finalidad de hacer frente a los fenómenos de resistencia y persistencia bacteriana, se han explorado varias estrategias anti-virulencia (115), entre ellas, las que tienen como blanco inhibir la adhesión bacteriana a la célula hospedera; inhibir las toxinas o los sistemas especializados de secreción (116); bloquear receptores bacterianos (57, 58), o interferir con la regulación de los

genes relacionados con la virulencia (56, 117). Esta última, ha sido la más abordada particularmente con el sistema de comunicación bacteriana Quorum Sensing (QS). Este sistema (QS), es uno de los principales candidatos blanco para el desarrollo de drogas antimicrobianas para tratar infecciones bacterianas agudas, crónicas o persistentes; debido a que esta vía (QS), regula la expresión y producción coordinada de un amplio rango de factores de virulencia en diversos patógenos, y son dispensables para la supervivencia bacteriana (54, 56, 57, 118-122). Sin embargo, pese a que está reportado en modelos como *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* y *Dictyostelium discoideum*, que mutantes de la comunicación bacteriana son atenuados en su virulencia (12, 15, 18, 87, 123, 124), no todos los genes de virulencia están bajo el control del sistema QS; además, se ha visto que las bacterias pueden desarrollar resistencia a estos inhibidores (125). Por esta razón, se ratifica como blanco exitoso a los polifosfatos (poliP), específicamente la enzima PPK1, que constituye un "regulador global" de virulencia, debido a que numerosos genes de virulencia que son dependientes y otros independientes del sistema de comunicación bacteriana (Quorum sensing), disminuyen su expresión en el mutante *ppk1*- (12, 34). Esto es válido, para numerosas bacterias patógenas incluyendo a *P. aeruginosa*, cuya atenuación fue corroborada en este estudio y donde se ha constatado que mutaciones en el gen *ppk1*, afectan la comunicación bacteriana vía QS y la virulencia (12, 23, 34, 41, 44, 46, 52, 126).

Sin embargo, el diseño de nuevas drogas debe considerar ciertos aspectos que tienen que ver no sólo con que sea efectivo contra la virulencia del patógeno, sino que sea inocuo frente al hospedero y a sus bacterias beneficiosas. Por esta

razón, es que en este trabajo, en base a moléculas anti-virulencia diseñadas previamente, se propusieron tres requisitos que debían cumplir estos compuestos, y para esto, se buscó un hospedero que tuviese ciertas características que permitieran evaluar la inocuidad del compuesto hacia él, y la bacteria beneficiosa, además del efecto buscado en atenuar la virulencia de *P. aeruginosa*. Así, con estas moléculas anti-virulencia, donde no se somete al patógeno a una presión selectiva letal como con los antibióticos, se estaría haciendo frente además, al fenómeno de persistencia bacteriana.

Tales requisitos, fueron verificados en sus capacidades anti-virulencia con un ensayo *in vivo*, en el que se pudo corroborar exitosamente que, al tener como blanco la PPK1, se logra un alto grado de especificidad y se apunta a un amplio espectro de patógenos, al ser una enzima evolutivamente conservada entre estas bacterias; no interfieren con el crecimiento o la viabilidad del patógeno por lo que se evitaría el desarrollo de resistencias además de no afectar ni al hospedero ni a la bacteria beneficiosa.

Gracias a la determinación de la estructura de la PPK1 de *Escherichia coli* (53), y su único sitio activo de unión para el ATP, fue posible modelar la estructura de la PPK1 de *P. aeruginosa* y buscar mediante diseño *in silico* de drogas, posibles moléculas inhibitorias de la PPK1.

Además, enzimas homólogas a PPK1 han sido encontradas en más de 100 especies procariontes, entre ellos numerosos patógenos, y hasta la fecha, solo en algunos eucariontes como *Dictyostelium discoideum* (DdPPK1), *Candida humicola* y algunos organismos fotosintéticos (33, 36-39). La secuencia de aminoácidos de

DdPPK1, comparte características estructurales similares con las enzimas procariontes en el único sitio activo de unión al ATP (30% de identidad y 51% de similitud) (33, 34, 37-39, 53), y es esencial en este organismo para su desarrollo, esporulación y predación bacteriana (38).

Para nuestros propósitos de crear moléculas que no tengan efectos secundarios, *D. discoideum* es el modelo ideal para la búsqueda de compuestos anti-virulencia que tengan como blanco la PPK1 bacteriana, pues si los compuestos no solo afectan al patógeno sino también a la ameba, el desarrollo de la ameba se verá perturbado. Es decir, nuestro modelo hospedero-patógeno nos permite distinguir aquellos inhibidores que sean capaces de afectar específicamente a la PPK1 de la bacteria y no a la ameba.

Debido a los inconvenientes éticos que demanda el uso de modelos eucariontes superiores y las ventajas que posee *Dictyostelium discoideum*, es que en este estudio se utilizó como modelo biológico esta ameba social; mediante un ensayo sumamente sencillo, novedoso, además de fácil de interpretar; que permitió evaluar a gran escala, el efecto de numerosos compuestos inhibidores de la PPK1 en la virulencia de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1. Nuestros resultados, permitieron comprobar la efectividad de estos inhibidores en atenuar la virulencia de la cepa silvestre de *P. aeruginosa*, y además, poner a prueba la toxicidad de los mismos hacia la bacteria beneficiosa y el hospedero, lo que en este estudio se denominó "ensayo de efectos secundarios". Los resultados obtenidos, confirmaron lo esperado, 14 de los 32 compuestos ensayados fueron efectivos en atenuar la virulencia de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* PAO1, sin

perturbar ni al hospedero ni a su bacteria beneficiosa, ni actuar como un antibiótico. Entre los compuestos con mayor actividad anti-virulencia, destaca el número 28 (NSC-696924), debido a que otro compuesto también derivado de triazinas, ha sido reportado por su actividad anti-virulencia en *K. pneumoniae* hacia otro hospedero alternativo, el protozoo *Tetrahymena pyriformis* (127). Curiosamente, en el mismo trabajo se señala la dificultad de utilizar a *D. discoideum* para este tipo de ensayos.

Otra razón que valida la utilización de *D. discoideum*, como modelo para la evaluación del efecto de drogas de importancia para los humanos, es que comparte con las células de eucariontes superiores, varios procesos celulares y genes homólogos adyacentes (128). Además, la membrana plasmática está directamente expuesta al medio extracelular, y su composición no es muy diferente a la de éstos –excepto que el colesterol es sustituido por ergosterol y que entre los residuos de carbohidratos de proteínas o glicolípidos el ácido siálico está ausente- (129). Es por esto que, *D. discoideum* se ha usado para ensayos farmacológicos, donde se ha demostrado que drogas que afectan las células de mamíferos, han sido efectivas también en la ameba –aunque en algunos casos en concentraciones más altas-.

En varios artículos científicos, se manifiesta la necesidad de buscar y diseñar nuevas drogas antimicrobianas que no apunten a erradicar el patógeno (34, 52, 54, 115), ya que conlleva al desarrollo de cepas resistentes a múltiples drogas (MDR). No obstante, pocos reportes hay respecto a inhibidores de la PPK1; uno de ellos, es el citado por Chávez *et al.* (2011) (52), donde Arthur

Kornberg, mediante un ensayo enzimático *in vitro*, evaluó la actividad inhibitoria sobre la PPK1 de *E. coli*, de compuestos seleccionados de la Biblioteca química ICOS¹; los cuales, mostraron potencial inhibitorio en la acumulación de poliP *in vitro*; sin embargo, en el ensayo *in vivo* con *E. coli*, los compuestos indujeron respuestas celulares distintas, algunos inhibiendo drásticamente la acumulación de poliP en la célula (más del 60%), mientras que otros, casi no mostraron diferencias en contraste con las muestras control; lo cual evidencia la necesidad de evaluar *in vivo* el efecto de estas drogas.

Es por esta razón, que este estudio, tuvo como finalidad evaluar el efecto *in vivo* de las moléculas antimicrobianas previamente diseñadas (52), con el objetivo de evidenciar una disminución en la virulencia de la cepa silvestre de *P. aeruginosa*. En la actualidad, en nuestro Laboratorio, se realizan ensayos enzimáticos *in vitro*, para contrastar los resultados obtenidos *in vivo* presentados en este trabajo y demostrar que estas moléculas son capaces de inhibir la actividad de la enzima PPK1 de *P. aeruginosa*.

Pese a que se ha reportado la utilidad de usar a *D. discoideum* como modelo biológico para evaluar el efecto de drogas y fármacos, éstos han tenido como blanco células humanas (77-81), pero no apuntan a patógenos bacterianos.

En síntesis, podemos contestar afirmativamente nuestra hipótesis de trabajo, ya que demostramos que la ameba del suelo *Dictyostelium discoideum* es un excelente modelo para evaluar además de la virulencia bacteriana, el efecto de compuestos inhibidores que pretenden inhibirla, que no afecten ni al hospedero ni a sus bacterias beneficiosas. Además, la enzima polifosfato quinasa 1 (PPK1) es

un buen blanco para el diseño de compuestos anti-virulencia que no tengan efecto secundario en el hospedero, los cuales fueron efectivos en atenuar la virulencia de *P. aeruginosa* silvestre.

Descubrimos nuevos compuestos anti-virulencia que tienen como blanco la PPK1 de *P. aeruginosa* mediante un ensayo sencillo, de bajo costo y a gran escala. Nuestro trabajo, constituye el primer estudio que emplea a *D. discoideum* como modelo hospedero-patógeno para la búsqueda de compuestos antimicrobianos, y además, el primer trabajo en demostrar que la síntesis de los poliP y particularmente la enzima PPK1 es un blanco celular adecuado para el diseño de nuevas moléculas antimicrobianas (Figura 13).

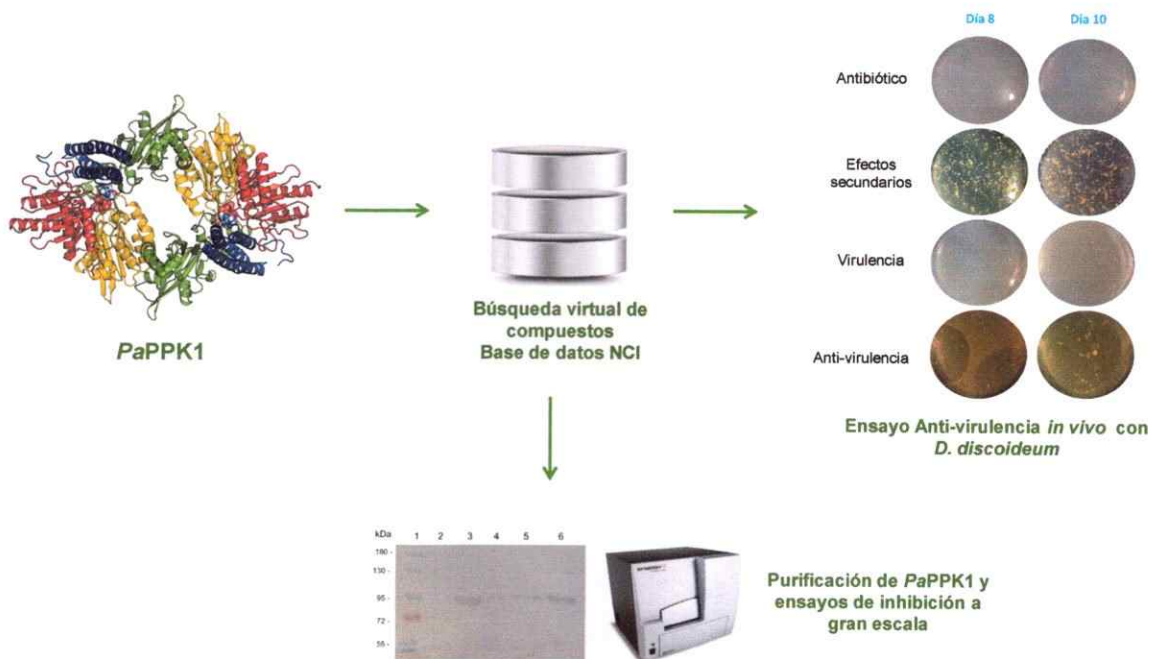


Figura 13. Esquema del ensayo validado en este estudio para evaluar a gran escala el efecto en la virulencia bacteriana de compuestos inhibidores de la PPK1 utilizando a *D. discoideum* como modelo biológico.



El trabajo realizado con la ameba social *Dictyostelium discoideum*, además de permitir la realización de esta Tesis de magister y la instauración de este modelo biológico en el Laboratorio de Microbiología de Sistemas (Sysmicrolab) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile; deja como producto un Manual de Protocolos para su cultivo y mantención; destacando a la vez otros alcances, como la pronta publicación de un artículo científico con parte del trabajo presentado en esta tesis (Objetivo específico n° 3); la participación en el Curso Biología del Desarrollo (*Dictyostelium discoideum*: Desarrollo y utilidad como modelo hospedero-patógeno, 2013-2014); la participación en el XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología, ALAM 2014 (Cartagena de Indias, Colombia) y en el XXXV y XXXVI Congreso Chileno de Microbiología, SOMICH 2013 (Maitencillo, Chile) y SOMICH 2014 (La Serena, Chile), y la contribución en Actividades de Extensión en Colegios de la región (2013-2014).

5. CONCLUSIONES

- ✓ Establecimos un protocolo de desarrollo social con la ameba *D. discoideum* para evaluar a gran escala la virulencia de *P. aeruginosa*.
- ✓ A diferencia de lo observado con la cepa silvestre, el mutante *ppk1-* permite la culminación del desarrollo social de la ameba, lo que corrobora su fenotipo de virulencia atenuada.
- ✓ En contraste, el mutante *ppk2-* resultó ser hipervirulento para el desarrollo de *D. discoideum* lo que coincide con el fenotipo observado en el modelo del pez cebra (*Danio rerio*).
- ✓ De los ensayos con los mutantes deficientes en la síntesis de pigmentos tóxicos, comprobamos que sólo el sideróforo pioverdina es necesario para la virulencia de *P. aeruginosa* en este modelo. Por su parte, el mutante de piocianina (*phzM-*) resultó ser hipervirulento en nuestros experimentos.
- ✓ Mediante nuestros ensayos de anti-virulencia, pudimos encontrar 14 moléculas diseñadas para inhibir la PPK1 que fueron capaces de atenuar la virulencia de *P. aeruginosa* hacia *D. discoideum*. Adicionalmente, estas moléculas no afectaron ni al hospedero (*D. discoideum*) ni a la bacteria beneficiosa (*K. aerogenes*).

6. REFERENCIAS

1. Lee D, Urbach J, Wu G, Liberati N, Feinbaum R, Miyata S, Diggins L, He J, Saucier M, Déziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme L, Ausubel F (2006): Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biology*, **7**: R90.
2. Hare N, Solis N, Harmer C, Marzook B, Rose B, Harbour C, Crossett B, Manos J, Cordwell S (2012): Proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* AES-1R, PAO1 and PA14 strains reveals potential virulence determinants associated with a transmissible cystic fibrosis-associated strain. *BMC Microbiol*, **12**: 16.
3. Rahme L, Tan M, Le L, Wong S, Tompkins R, Calderwood S, Ausubel F (1997): Use of model plant hosts to identify *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 13245–13250.
4. Chugani S, Whiteley M, Lee K, D'Argenio D, Manoil C, Greenberg E (2001): QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 2752–2757.
5. Jander G, Rahme L, Ausubel F (2000): Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol*, **182**: 3843–3845.
6. Tan M, Rahme L, Sternberg J, Tompkins R, Ausubel F (1999): *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 2408–2413.
7. Steinert M (2011): Pathogen–host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens. *Semin Cell Dev Biol*, **22**: 70-76.
8. Hilbi H, Weber S, Ragaz C, Nyfeler Y, Urwyler S (2007): Environmental predators as models for bacterial pathogenesis. *Environ Microbiol*, **9**: 563-575.

9. Mahajan-Miklos S, Rahme L, Ausubel F (2000): Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Molecular Microbiology*, **37**: 981-988.
10. Driscoll J, Brody S, Kollef M (2007): The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, **67**: 351–368.
11. Lyczak J, Cannon C, Pier G (2000): Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect*, **2**: 1051-1060.
12. Rashid M, Rumbaugh K, Passador L, Davies D, Hamood A, Iglewski B, Kornberg A (2000): Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 9636-9641.
13. Van Delden C, Iglewski B (1998): Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis*, **4**: 551-560.
14. Yahr T, Wolfgang M (2006): Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol Microbiol*, **62**: 631-640.
15. Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, Benghezal M, et al. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a *Dictyostelium discoideum* host system. *J Bacteriol*, **184**: 3027-3033.
16. Jimenez P, Koch G, Thompson J, Xavier K, Cool R, Quax W (2012): The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **76**: 46-65.
17. Wade D, Calfee M, Rocha E, Ling E, Engstrom E, Coleman J, Pesci E (2005): Regulation of *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, **187**: 4372-4380.

18. Alibaud L, Köhler T, Coudray A, Prigent-Combaret C, Bergeret E, Perrin J, Benghezal M, Reimann C, Gauthier Y, Van Delden C, Attree I, Fauvarque M, Cosson P (2008): *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes identified in a *Dictyostelium* host model. *Cellular Microbiology*, **10**: 729–740.
19. Pukatzki S, Kessin R, Mekalanos J (2002): The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* utilizes conserved virulence pathways to infect the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 3159–3164.
20. Martin L, Reid D, Sharples K, Lamont I (2011): *Pseudomonas* siderophores in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Biometals*, **24**: 1059-1067.
21. Cornelis P, Dingemans J (2013): *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol*, **3**: 75.
22. Mahajan-Miklos S, Tan M, Rahme L, Ausubel F (1999): Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa*–*Caenorhabditis elegans* Pathogenesis Model. *Cell*, **96**: 47–56.
23. Ortiz-Severín J (2012): Análisis de los cambios proteómicos y fenotípicos de los mutantes en la síntesis de los polifosfatos en *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Director: Francisco P. Chávez. *Tesis de Magíster no publicada*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Santiago, Chile.
24. Lamont I, Beare P, Ochsner U, Vasil A, Vasil M (2002): Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 7072-7077.
25. Banin E, Vasil M, Greenberg E (2005): Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**: 11076-11081.
26. Nadal Jimenez P, Koch G, Papaioannou E, Wahjudi M, Krzeslak J, Coenye T, Cool R, Quax W (2010): Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiol*, **156**: 49-59.

27. Breidenstein E, De la Fuente-Núñez C, Hancock R (2011): *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends in Microbiol*, **19**: 419-426.
28. Hancock R (1986): Intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemoth*, **18**: 653-656.
29. Rahme L, Stevens E, Wolfort S, Shao J, Tompkins R, Ausubel F (1995): Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, **268**: 1899-1902.
30. Macià M, Pérez J, Molin S, Oliver A (2011): Dynamics of Mutator and antibiotic-resistant populations in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm treatment. *Antimicrob agents Ch*, **55**: 5230-5237.
31. Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K (2013): (p)ppGpp Controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell*, **154**: 1140-1150.
32. Bigger J (1944): Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet*, **244**: 497-500.
33. Kornberg A, Rao N, Ault-Riché D (1999): Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu Rev Biochem*, **68**: 89-125.
34. Rao NN, Gómez-García M, Kornberg A (2009): Inorganic Polyphosphate: Essential for Growth and Survival. *Annu Rev Biochem*, **78**: 605-647.
35. Zhang H, Ishige K, Kornberg A (2002): A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 16678-16683.
36. Whitehead M, Hooley P, W Brown M (2013): Horizontal transfer of bacterial polyphosphate kinases to eukaryotes: implications for the ice age and land colonization. *BMC Res Notes*, **6**:221.

- 37. Eichinger L, et al (2005):** The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **435**: 43–57.
- 38. Zhang H, Gómez-García M, Brown M, Kornberg A (2005):** Inorganic polyphosphate in *Dictyostelium discoideum*: Influence on development, sporulation, and predation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**: 2731-2735.
- 39. Zhang H, Gomez-Garcia MR, Shi X, Rao N, Kornberg A (2007):** Polyphosphate kinase 1, a conserved bacterial enzyme, in a eukaryote, *Dictyostelium discoideum*, with a role in cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**: 16486-16491.
- 40. Rashid M, Kornberg A (2000):** Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 4885-4890.
- 41. Fraley C, Rashid M, Lee S, Gottschalk R, Harrison J, Wood P, Brown M, Kornberg A (2007):** A polyphosphate kinase 1 (ppk1) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**: 3526-2531.
- 42. Brown M, Kornberg A (2004):** Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**: 16085-16087.
- 43. Parks Q, Hobden J (2005):** Polyphosphate kinase 1 and the ocular virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Investig Ophthalmol Vis Sci*, **46**: 248-251.
- 44. Kim K, Rao N, Fraley C, Kornberg A (2002):** Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc Nat Acad Sci USA*, **99**: 7675-7680.
- 45. Ogawa N, Tzeng C, Fraley C, Kornberg A (2000):** Inorganic Polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *J Bacteriol*, **182**: 6687-6693.

- 46. Tinsley C, Gotschlich E (1995):** Cloning and characterization of the *meningococcal* polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutants. *Infect Immun*, **63**: 1624- 1630.
- 47. Sureka K, Dey S, Datta P, Singh A, Dasgupta A, Rodrigue S, Basu J, Kundu M (2007):** Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in *mycobacteria*. *Mol Microbiol*, **65**: 261-276.
- 48. Ayraud S, Janvier B, Labigne A, Ecobichon C, Burucoa C, Fauchère J (2005):** Polyphosphate kinase: a new colonization factor of *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett*, **243**: 45-50.
- 49. Candon H, Allan B, Fraley C, Gaynor E (2007):** Polyphosphate kinase 1 is a pathogenesis determinant in *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* , **189**: 8099-8108.
- 50. Gangaiah D, Kassem I, Liu Z, Rajashekara G (2009):** Importance of polyphosphate kinase 1 for *Campylobacter jejuni* viable-but-nonculturable cell formation, natural transformation, and antimicrobial resistance. *Appl Environ Microbiol*, **75**: 7838-7849.
- 51. Ishige K, Zhang H, Kornberg A (2002):** Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 16684-16688.
- 52. Chávez FP, Lagos C, Reyes-Parada M, Guilliani N, Jerez C (2011):** Polyphosphate synthesis as a target for novel antibiotics. *Current Enzyme Inhibition*, **7**: 163-168.
- 53. Zhu Y, Huang W, Lee S, Xu W (2005):** Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO reports*, **6**: 681-687.
- 54. Starkey M, Lepine F, Maura D, Bandyopadhyaya A, Lesic B, He J, Kitao T, Righi V, Milot S, Tzika A, Rahme L (2014):** Identification of anti-virulence compounds that disrupt quorum-sensing regulated acute and persistent pathogenicity. *PLOS Pathogens*, **10**.
- 55. Pournaras S, Iosifidis E, Rollides E (2009):** Advances in antibacterial therapy against emerging bacterial pathogens. *Sem Hematol*, **46**: 198-211.

- 56. Rasko D, Sperandio V (2010):** Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov*, **9**: 117-128.
- 57. Rasko D, Moreira C, Li de R, Reading N, Ritchie J, Waldor M, et al. (2008):** Targeting QseC signaling and virulence for antibiotic development. *Science*, **321**: 1078–1080.
- 58. Curtis M, Russell R, Moreira C, Adebessin A, Wang C, Williams N, Taussig R, Stewart D, Zimmern P, Lu B, Prasad RN, Zhu C, Rasko D, Huntley J, Falck J, Sperandio V (2014):** QseC inhibitors as an antivirulence approach for Gram-negative pathogens. *MBio*, **5**.
- 59. Froquet R, Lelong E, Marchetti A, Cosson P (2009):** *Dictyostelium discoideum*: a model host to measure bacterial virulence. *Nature Protoc*, **4**: 25-30.
- 60. Kurz C, Ewbank J (2007):** Infection in a dish: high-throughput analyses of bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*, **10**: 10-16.
- 61. Conti F, Abnave P, Ghigo E (2014):** Unconventional animal models: a booster for new advances in host—pathogen interactions. *Front Cell Infect Microbiol*, **4**:142.
- 62. Kessin R (1981):** Conservatism in slime mold development. *Cell*, **27**: 241–243.
- 63. Chisholm RL, Firtel R (2004):** Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**: 531-541.
- 64. Sussman R, Sussman M (1967):** Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic medium. *Biochem Biophys Res Commun*, **29**: 53-55.
- 65. Watts D, Ashworth J (1970):** Growth of myxameobae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem J*, **119**: 171-174.
- 66. Ashworth J, Watts D (1970):** Metabolism of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* grown in axenic culture. *Biochem J*, **119**: 175-182.

67. Parent C (2004): Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and *Dictyostelium*. *Curr Opin Cell Biol*, **16**: 4-13.
68. Van Haastert P, Devreotes P (2004): Chemotaxis: signaling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**: 626-634.
69. Manahan C, Iglesias P, Long Y, Devreotes P (2004): Chemoattractant signaling in *Dictyostelium discoideum*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**: 223-253.
70. Titus M (2000): The role of unconventional myosins in *Dictyostelium* endocytosis. *J Eukaryot Microbiol*, **47**: 191-196.
71. Maniak M (2002): Conserved features of endocytosis in *Dictyostelium*. *Int Rev Cytol*, **221**: 257-287.
72. Williams H, Harwood A (2003): Cell polarity and *Dictyostelium* development. *Curr Opin Microbiol*, **6**: 621-627.
73. Tosetti N, Croxatto A, Greub G (2014): Amoebae as a tool to isolate new bacterial species, to discover new virulence factors and to study the host-pathogen interactions. *Microb Pathog*, **77**: 125-130.
74. Bozzaro S, Eichinger L (2011): The professional phagocyte *Dictyostelium discoideum* as a model host for bacterial pathogens. *Current Drug Targets*, **12**: 942-954.
75. Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson W, Heidelberg J, Mekalanos J (2006): Identification of a conserved bacterial protein secretionsystem in *Vibrio cholera* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 1528-1533.
76. Aubert D, Flannagan R, Valvano M (2008): A novel sensor kinase-response regulator hybrid controls biofilm formation and type VI secretion system activity in *Burkholderia cenocepacia*. *Infect Immun*, **76**: 1979-1991.

- 77. Dannat K, Tillner J, Winckler T, Weiss M, Eger K, Dingermann T (2003):** Effects of medicinal compounds on the differentiation of the eukaryotic microorganism *Dictyostelium discoideum*: can this model be used as a screening test for reproductive toxicity in humans? *Pharmazie*, **58**: 204-210.
- 78. Alexander S, Min J, Alexander H (2006):** *Dictyostelium discoideum* to human cells: pharmacogenetic studies demonstrate a role for sphingolipids in chemoresistance. *Biochim Biophys Acta*, **1760**: 301-309.
- 79. Li G, Alexander H, Schneider N, Alexander S (2000):** Molecular basis for resistance to the anticancer drug cisplatin in *Dictyostelium*. *Microbiol*, **146**: 2219–2227.
- 80. Williams R, Eames M, Ryves W, Viggars J, Harwood A (1999):** Loss of a prolyl oligopeptidase confers resistance to lithium by elevation of inositol (1,4,5) trisphosphate. *EMBO J*, **18**: 2734–2745.
- 81. Grove J, Brown R, Watts D (2000):** The intracellular target for the antiresorptive aminobisphosphonate drugs in *Dictyostelium discoideum* is the enzyme farnesyl diphosphate synthase. *J Bone Miner Res*, **15**: 971–981.
- 82. Bozzaro S, Bucci C, Steinert M (2008):** Phagocytosis and host-pathogen interactions in *Dictyostelium* with a look at macrophages. *Int Rev Cell Mol Biol*, **271**: 253-300.
- 83. Clarke M (2010):** Recent insights into host-pathogen interactions from *Dictyostelium*. *Cell Microbiol*, **12**: 283-291.
- 84. Isberg R, O'Connor T, Heidtman M (2009):** The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells. *Nature Rev Microbiol*, **7**: 12-24.
- 85. Williams J (2010):** *Dictyostelium* Finds New Roles to Model. *Genetics*, **185**: 717–726.
- 86. Greub G, Raoult D (2004):** Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin Microbiol Rev*, **17**: 413-433.

- 87. Lelong E, Maechetti A, Simon M, Burns J, Van Delden C, Köhler T, Cosson P (2011): Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence in infected patients revealed in a *Dictyostelium discoideum* host model. *Clin Microbiol Infect*, **17**: 1415-1420.**
- 88. D'Árgenio D, Gallagher L, Berg C, Manoil C (2001): Drosophila as a model host for *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Bacteriol*, **183**: 1466-1471.**
- 89. Erickson D, Lines J, Pesci E, Venturi V, Storey D (2004): *Pseudomonas aeruginosa* relA contributes to virulence in *Drosophila melanogaster*. *Infect Immun*, **72**: 5638-5645.**
- 90. Sifri C, Begun J, Ausubel F (2005): The worm has turned – microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol*, **13**: 119-127.**
- 91. Palominos, MF, Verdugo L, Chávez F, Calixto A (2013): Diapausa inducida por *Pseudomonas aeruginosa* en *Caenorhabditis elegans* depende directamente de la virulencia bacteriana. Evento: XXXV Congreso Chileno de Microbiología, Maitencillo, Chile.**
- 92. Lecaros, Constanza (2015): Estudio de la virulencia de mutantes de la síntesis de los polifosfatos en *Pseudomonas aeruginosa* utilizando *Danio rerio* como modelo animal. Director: Francisco P. Chávez. Tesis de Pre-grado no publicada. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Santiago, Chile.**
- 93. Jacobs M, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C (2003): Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**: 14339-14344.**
- 94. Basu S, Fey P, Pandit Y, Dodson R, Kibbe W, Chisholm RL (2013): DictyBase 2013: Integrating multiple Dictyostelid species. *Nucleic Acids Research*, **41**.**
- 95. Fey P, Gaudet P, Pilcher K, Franke J, Chisholm RL (2006): dictyBase and the Dicty Stock Center. *Methods Mol Biol* (Clifton, N.J.), **346**: 51-74.**

- 96. Fey P, Kowal A, Gaudet P, Pilcher K, Chisholm RL (2007):** Protocols for growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Nat Protoc*, **2**: 1307-1316.
- 97. Lima W, Lelong E, Cosson P (2011):** What can *Dictyostelium* bring to the study of *Pseudomonas* infections? *Sem Cell Dev Biol*, **22**: 77-81.
- 98. Casadevall A, Pirofski L (2003):** The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, **1**:17-24.
- 99. Zaborin A, Romanowski K, Gerdes S, Holbrook C, Lepine F, Long J, Poroyko V, Diggle S, Wilke A, Righetti K, Morozova I, Babrowski T, Liu D, Zaborina O, Alverdy J (2009):** Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**: 6327-6332.
- 100. Carilla-Latorre S, Calvo-Garrido J, Bloomfield G, Skelton J, Kay R, Ivens, A, Martínez J, Escalante R (2008):** *Dictyostelium* transcriptional responses to *Pseudomonas aeruginosa*: common and specific effects from PAO1 and PA14 strains. *BMC Microbiol*, **8**:109.
- 101. Froquet R, Cherix N, Burr S, Frey J, Vilches S, Tomas J, Cosson P (2007):** Alternative host model to evaluate *Aeromonas* virulence. *Appl Environ Microbiol*, **73**: 5657-5659.
- 102. Sperandio D, Decoin V, Latour X, Mijouin L, Hillion M, Feuilloley M, Orange N, Merieau A (2012):** Virulence of the *Pseudomonas fluorescens* clinical strain MFN1032 towards *Dictyostelium discoideum* and macrophages in relation with type III secretion system. *BMC Microbiol*, **12**:223.
- 103. Gambino M, Kay R, Bozzaro S (1992):** Morphogenesis and differentiation of *Dictyostelium* cells interacting with immobilized glucosides: dependence on DIF production. *Differentiation*, **49**: 133-41.

- 104. McMorran B, Shanta Kumara H, Sullivan K, Lamont I (2001):** Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol*, **147**: 1517-1524.
- 105. Meyer J, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder I (1996):** Pyoverdin is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, **64**: 518–523.
- 106. Harrison F, Browning L, Vos M, Buckling A (2006):** Cooperation and virulence in acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. *BMC Biol*, **4**: 21.
- 107. Imperi F, Massai F, Facchini M, Frangipani E, Visaggio D, Leoni L, et al. (2013):** Repurposing the antimycotic drug flucytosine for suppression of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**: 7458–7463.
- 108. Wurst J, Drake E, Theriault J, Jewett I, VerPlank L, Perez J, Dandapani S, Palmer M, Moskowitz S, Schreiber S, Munoz B, Gulick A (2014):** Identification of inhibitors of PvdQ, an enzyme involved in the synthesis of the siderophore pyoverdine. *ACS Chem Biol*, **9**:1536-1544.
- 109. Clevenger K, Wu R, Liu D, Fast W (2014):** n-Alkylboronic acid inhibitors reveal determinants of ligand specificity in the quorum-quenching and siderophore biosynthetic enzyme PvdQ. *Biochemistry*, **53**: 6679-6686.
- 110. Takase H, Nitanaï H, Hoshino K, Otani T (2000):** Impact of siderophore production on *Pseudomonas aeruginosa* infections in immunosuppressed mice. *Infect Immun*, **68**: 1834-1839.
- 111. Hassan H, Fridovich I (1980):** Mechanism of the antibiotic action pyocyanine. *J Bacteriol*, **141**: 156-163.
- 112. Rahme L, Ausubel F, Cao H et al. (2000):** Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**: 8815–8821.

- 113. Chieda Y, Iiyama K, Lee J, Kusakabe T, Yasunaga-Aoki C, Shimizu S (2008):** Inactivation of pyocyanin synthesis genes has no effect on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the silkworm, *Bombyx mori*. *FEMS Microbiol Lett*, **278**: 101-107.
- 114. Essar D, Eberly L, Hadero A, Crawford I (1990):** Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol*, **172**: 884-900.
- 115. Cheng G, Hao H, Xie S, Wang X, Dai M, Huang L, Yuan Z (2014):** Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front Microbiol*, **5**:217.
- 116. McShan A, De Guzman R (2015):** The Bacterial Type III Secretion System as a Target for Developing New Antibiotics. *Chem Biol Drug Des*, **85**: 30-42.
- 117. El-Mowafi S, Sineva E, Alumasa J, Nicoloff H, Tomsho J, Ades S, Keiler K (2015):** Identification of inhibitors of a bacterial sigma factor using a new high-throughput screening assay. *Antimicrob Agents Chemother*, **59**: 193-205.
- 118. Njoroge J, Sperandio V (2009):** Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases. *EMBO Mol Med*, **1**: 201-210.
- 119. Hentzer M, Wu H, Andersen J, Riedel K, Rasmussen T, Bagge N, Kumar N, Schembri M, Song Z, et al. (2003):** Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. *EMBOJ*, **22**: 3803-3815.
- 120. Bhardwaj A, Vinothkumar K, Rajpara N (2013):** Bacterial quorum sensing inhibitors: attractive alternatives for control of infectious pathogens showing multiple drug resistance. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, **8**: 68-83.
- 121. Naik V, Mahajan G (2013):** Quorum sensing: a non-conventional target for antibiotic discovery. *Nat Prod Commun*, **8**: 1455-1458.

- 122. Sepahi E, Tarighi S, Ahmadi F, Bagheri A (2015):** Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* by two herbal essential oils from *Apiaceae* family. *J Microbiol*, **53**: 176-180.
- 123. Smith R, Iglewski B (2003):** *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol*, **6**: 56-60.
- 124. Juhas M, Eberl L, Tummler B (2005):** Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol*, **7**: 459-471.
- 125. Kalia V, Wood T, Kumar P (2014):** Evolution of resistance to quorum-sensing inhibitors. *Microb Ecol*, **68**:13-23.
- 126. Kassem I, Rajashekara G (2011):** An ancient molecule in a recalcitrant pathogen: the contributions of poly-P to the pathogenesis and stress responses of *Campylobacter jejuni*. *Future Microbiol*, **6**: 1117-1120.
- 127. Benghezal M, Adam E, Lucas A, Burn C, Orchard M, Deuschel C, Valentino E, Braillard S, Paccaud J, Cosson P (2007):** Inhibitors of bacterial virulence identified in a surrogate host model. *Cell Microbiol*, **9**: 1336-1342.
- 128. Williams J, Noegel A, Eichinger L (2005):** Manifestations of multicellularity: *Dictyostelium* reports in. *Trends Genet*, **21**: 392-398.
- 129. West C, McMahon D, Molday R (1978):** Identification of glycoproteins, using lectins as probes, in plasma membranes from *Dictyostelium discoideum* and human erythrocytes. *J Biol Chem*, **253**: 1716-1724.

7. ANEXOS

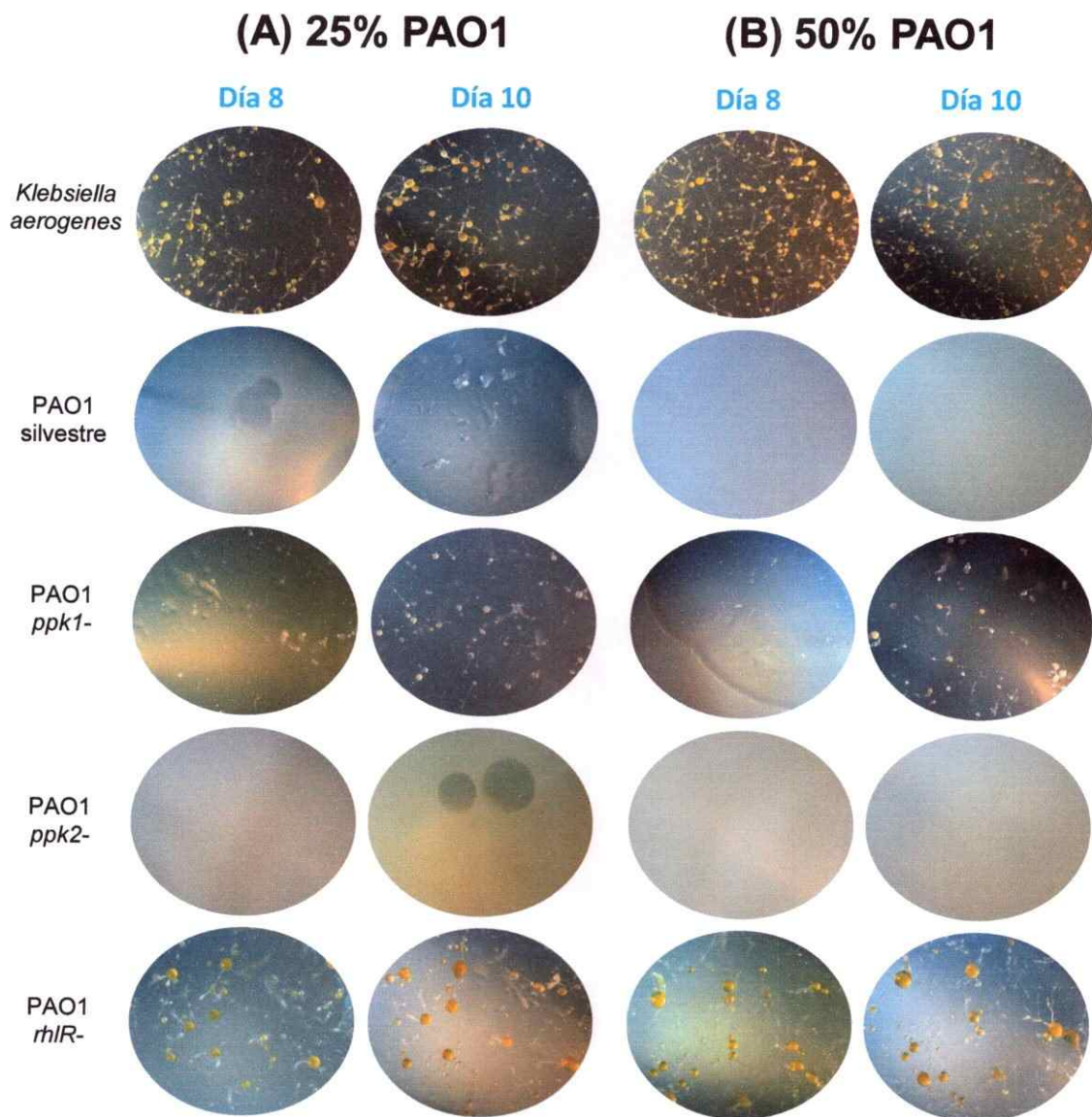


Figura suplementaria 1. Efecto de la virulencia de los mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 deficientes en la síntesis de los poliP en el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum*. Las imágenes de la izquierda, corresponden a la proporción de 25% PAO (A); y las de la derecha, a la proporción de 50% de PAO (B). Las columnas corresponden a los días 8 y 10 de observación de los experimentos; y las filas, a cada cepa. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 0.63x (Olympus, Japón).

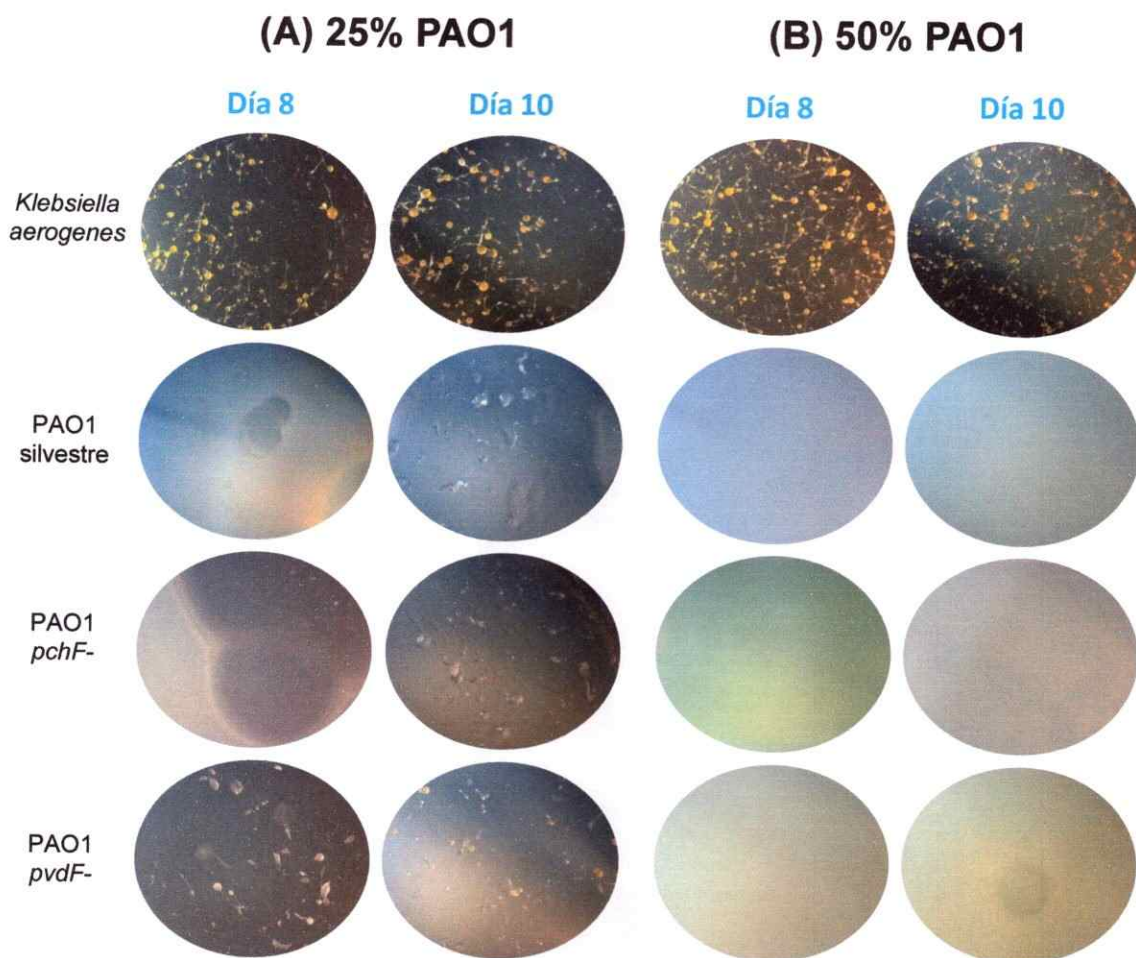


Figura suplementaria 2. Efecto de la virulencia de los mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 deficientes en la síntesis de los sideróforos pioverdina y pioquelina en el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum*. Las imágenes de la izquierda, corresponden a la proporción de 25% PAO (A); y las de la derecha, a la proporción de 50% de PAO (B). Las columnas corresponden a los días 8 y 10 de observación de los experimentos; y las filas, a cada cepa. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 0.63x (Olympus, Japón).

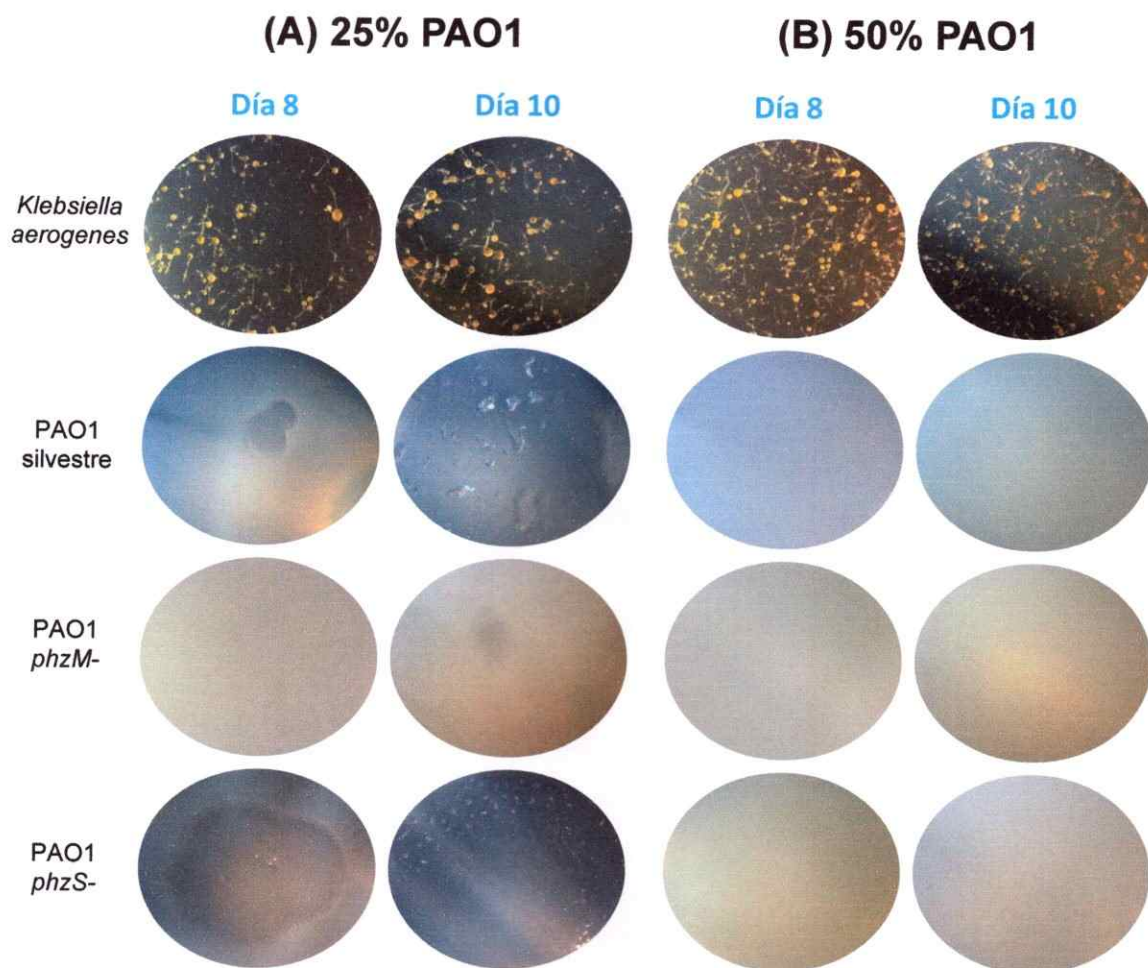


Figura suplementaria 3. Efecto de la virulencia de los mutantes de *P. aeruginosa* PAO1 deficientes en la síntesis del pigmento tóxico piocianina en el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum*. Las imágenes de la izquierda, corresponden a la proporción de 25% PAO (A); y las de la derecha, a la proporción de 50% de PAO (B). Las columnas corresponden a los días 8 y 10 de observación de los experimentos; y las filas, a cada cepa. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 0.63x (Olympus, Japón).

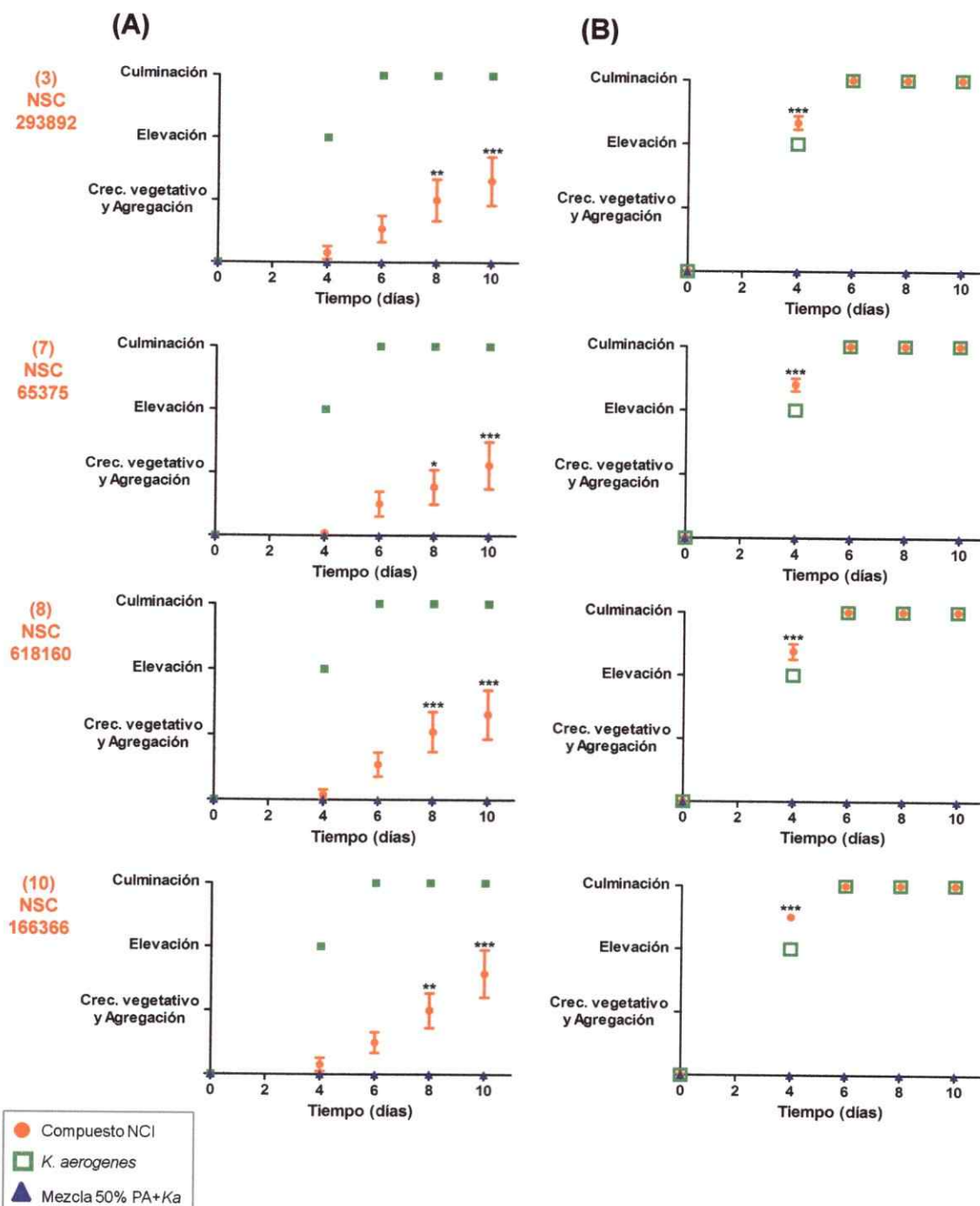


Figura suplementaria 4. Gráficos del efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. Las gráficas corresponden al Test anti-virulencia (A) y al Test de efectos secundarios (B). Se evaluó el efecto de cada compuesto en ambos test (A, B). Se muestra el promedio de cuatro réplicas biológicas realizadas en triplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni. [(*) : $P < 0.05$; (): $P < 0.01$; (***) : $P < 0.001$]**

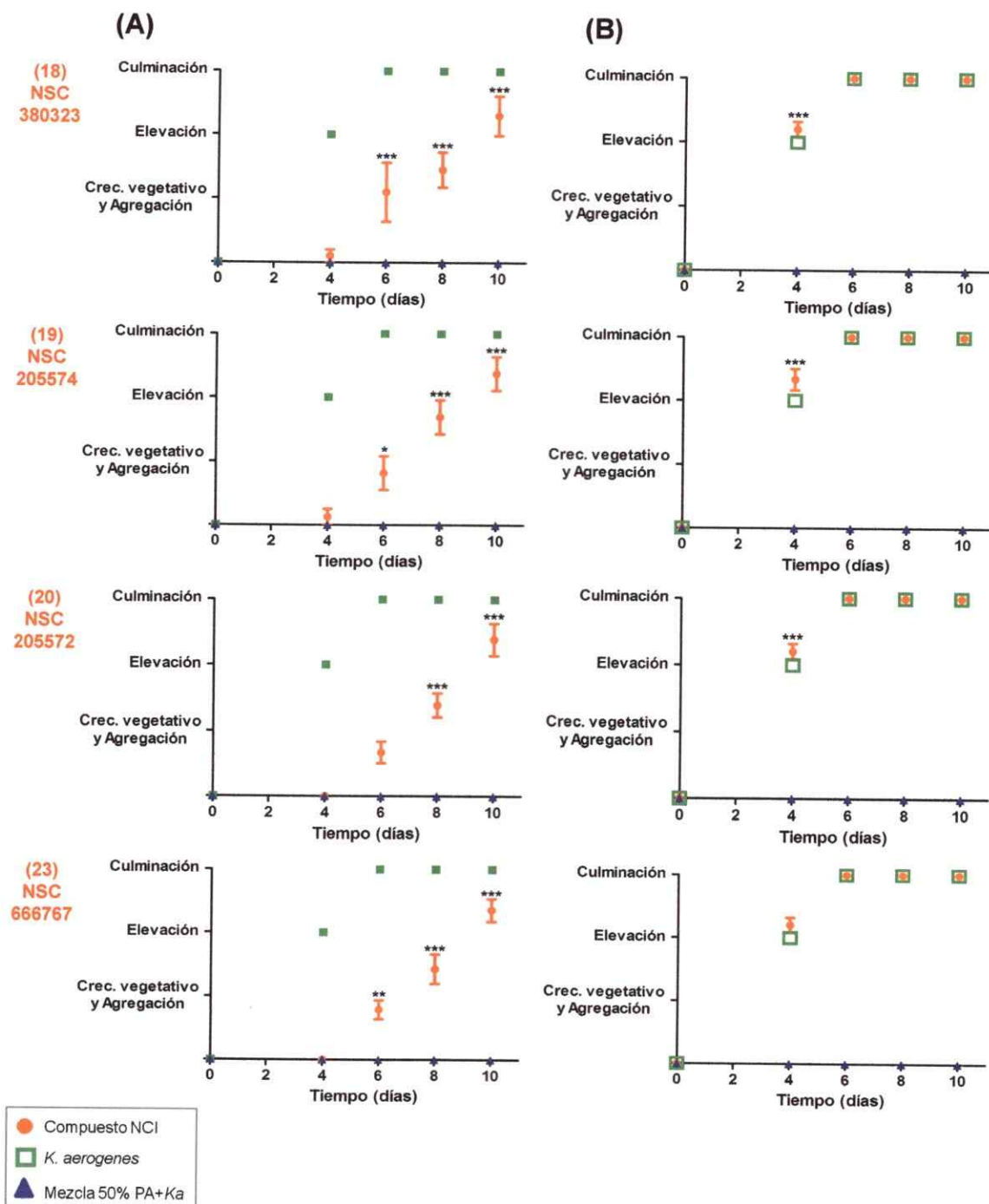


Figura suplementaria 5. Gráficos del efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. Las gráficas corresponden al Test anti-virulencia (A) y al Test de efectos secundarios (B). Se evaluó el efecto de cada compuesto en ambos test (A, B). Se muestra el promedio de cuatro réplicas biológicas realizadas en triplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni. [(*): $P < 0.05$; (): $P < 0.01$; (***) : $P < 0.001$]**

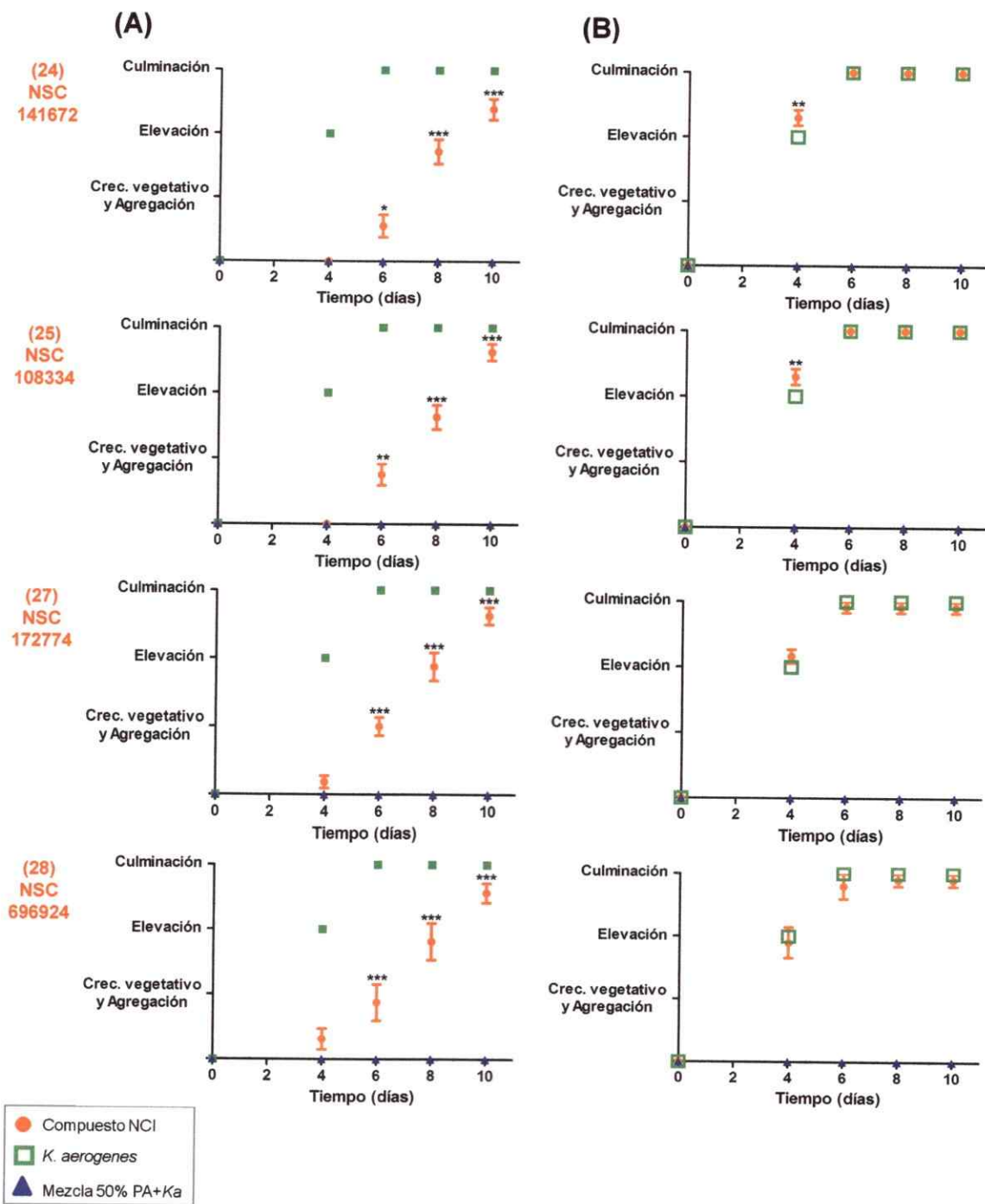


Figura suplementaria 6. Gráficos del efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. Las gráficas corresponden al Test anti-virulencia (A) y al Test de efectos secundarios (B). Se evaluó el efecto de cada compuesto en ambos test (A, B). Se muestra el promedio de cuatro réplicas biológicas realizadas en triplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni. [(*): $P < 0.05$; (): $P < 0.01$; (***) : $P < 0.001$]**

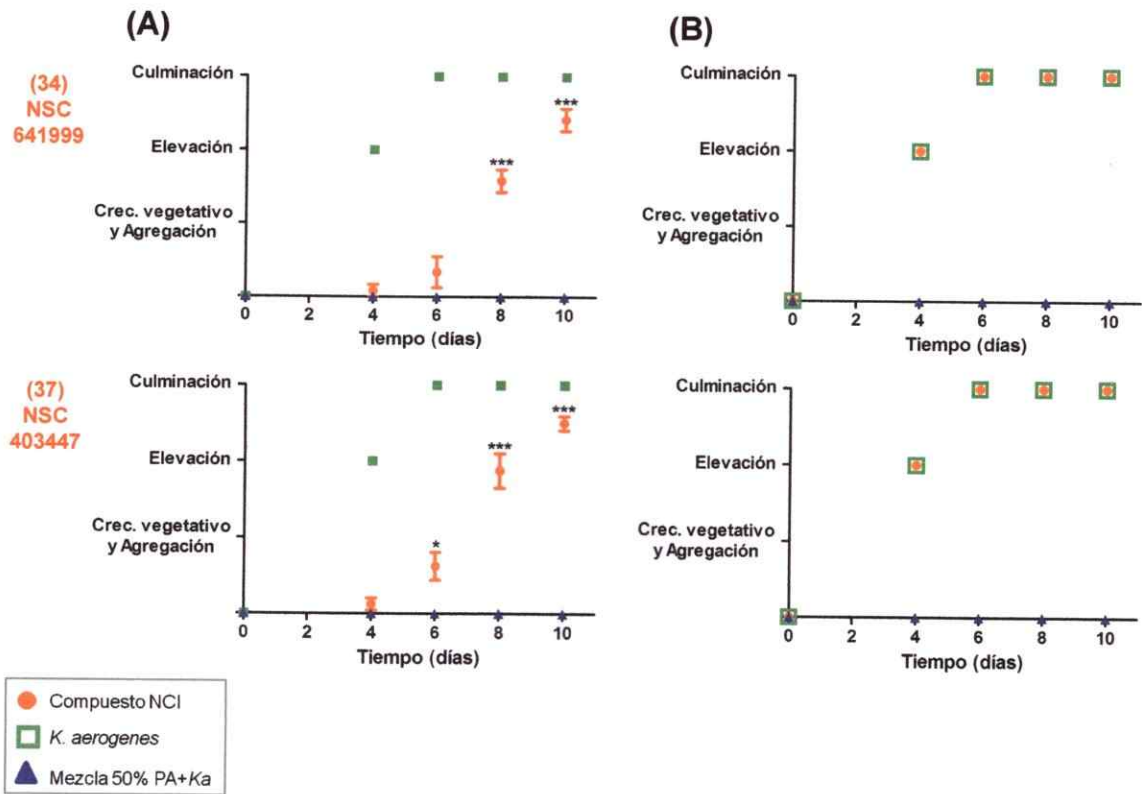


Figura suplementaria 7. Gráficos del efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. Las gráficas corresponden al Test anti-virulencia (A) y al Test de efectos secundarios (B). Se evaluó el efecto de cada compuesto en ambos test (A, B). Se muestra el promedio de cuatro réplicas biológicas realizadas en triplicado \pm error estándar. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas encontradas a partir de un ANOVA de dos vías, con un post-test de Bonferroni. [(*): $P < 0.05$; (): $P < 0.01$; (***) : $P < 0.001$]**

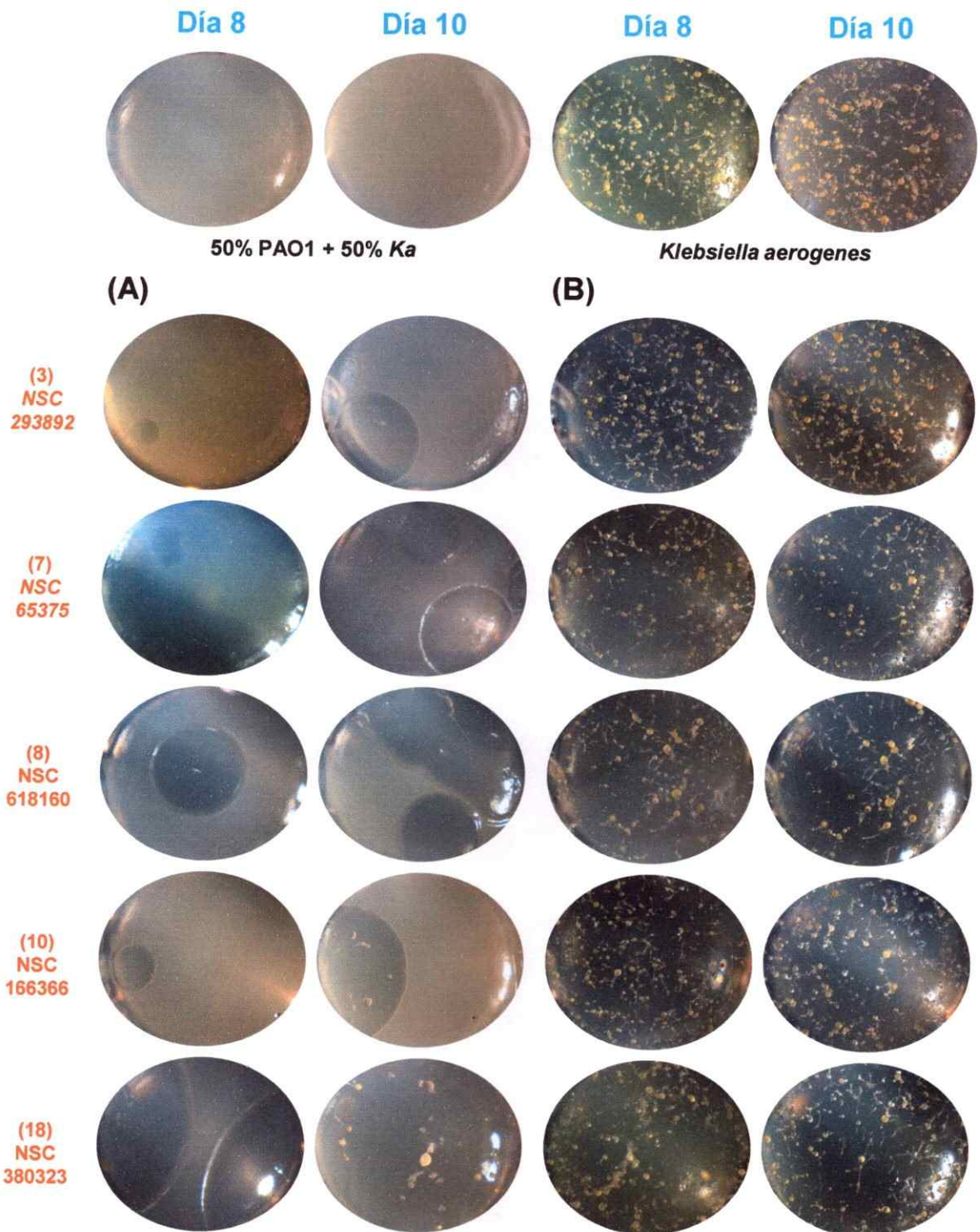


Figura suplementaria 8. Efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. Las imágenes muestran el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* en los días 8 y 10, en el Test anti-virulencia (A) y en el Test de efectos secundarios (B) ambos con sus respectivos controles en la parte superior. Se indica el número y el código NSC de cada compuesto. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 0.63x (Olympus, Japón).

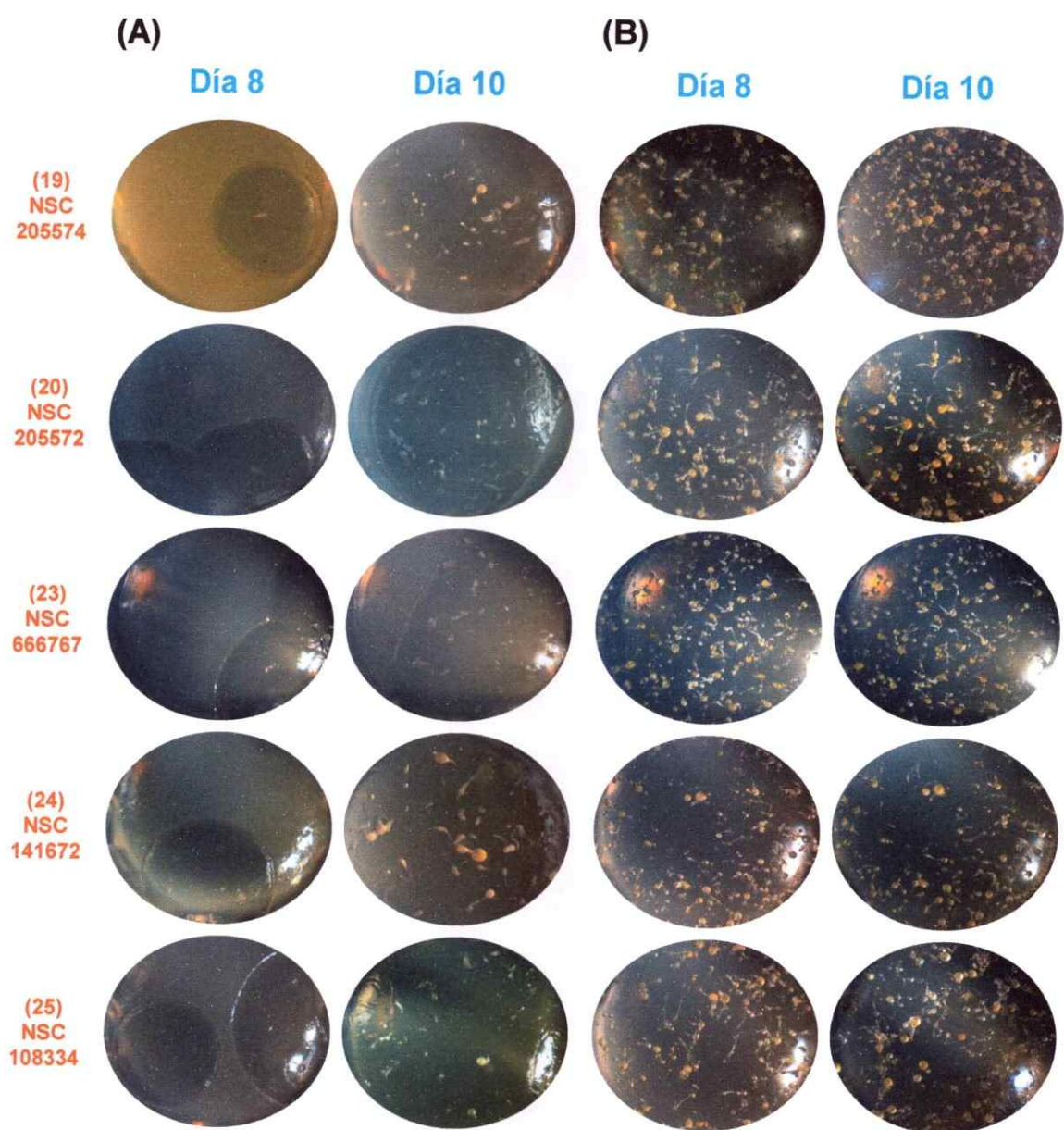


Figura suplementaria 9. Efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. Las imágenes muestran el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* en los días 8 y 10, en el Test anti-virulencia (A) y en el Test de efectos secundarios (B). Se indica el número y el código NSC de cada compuesto. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 0.63x (Olympus, Japón).

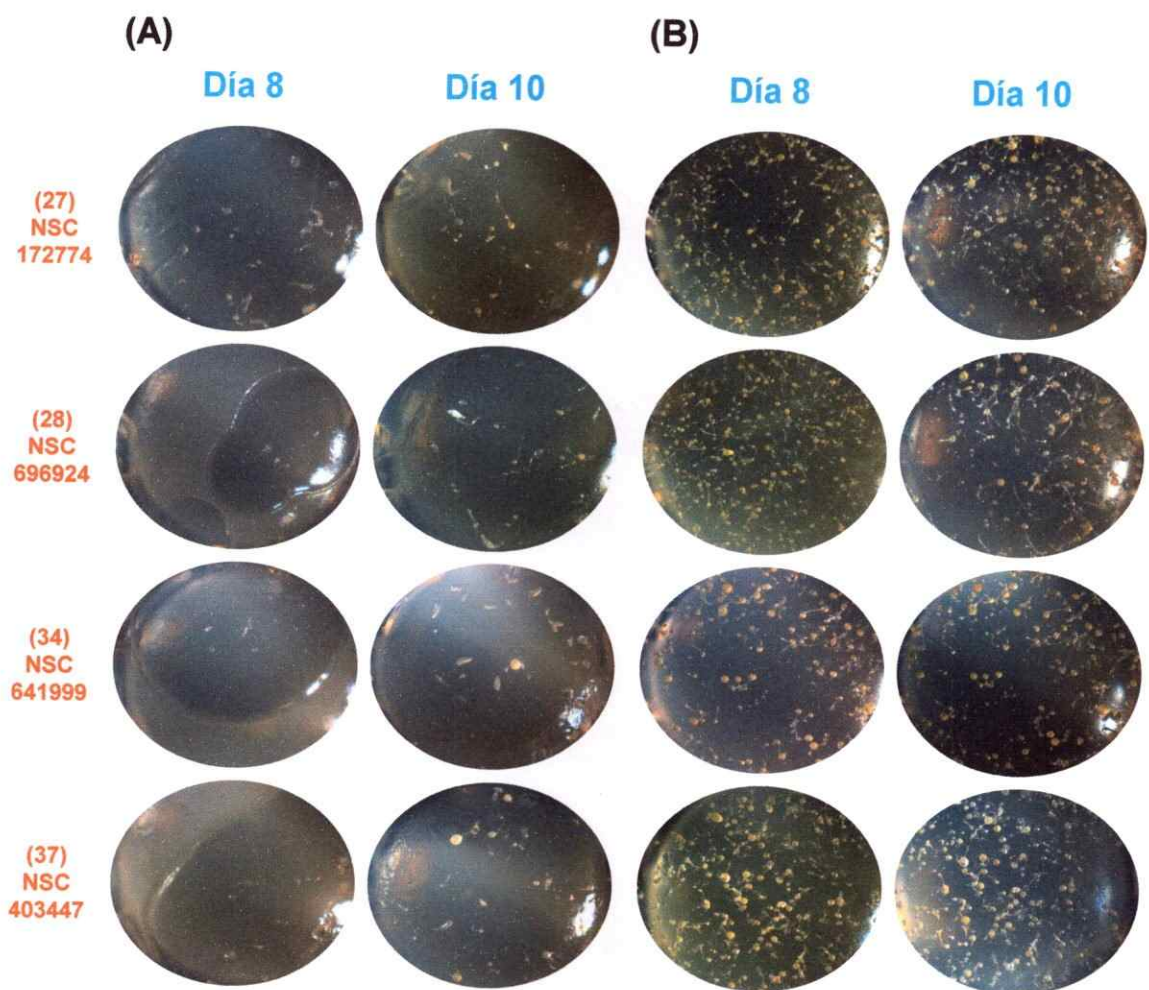


Figura suplementaria 10. Efecto de las moléculas químicas diseñadas *in silico*, en la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 silvestre (A) y sus efectos secundarios (B), evaluados en el modelo *D. discoideum*. Las imágenes muestran el crecimiento y desarrollo de *D. discoideum* en los días 8 y 10, en el Test anti-virulencia (A) y en el Test de efectos secundarios (B). Se indica el número y el código NSC de cada compuesto. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 0.63x (Olympus, Japón).