

UCH-FC
Biotecnología
L 456
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO



**ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DE MUTANTES DE LA SÍNTESIS DE LOS POLIFOSFATOS
EN *Pseudomonas aeruginosa* UTILIZANDO *Danio rerio* COMO MODELO ANIMAL**

Seminario de Título

Entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al título de

Ingeniera en Biotecnología Molecular

Constanza Lecaros Peillard

Noviembre-2015

Santiago-Chile

Director del Seminario de Título:

Dr. Francisco P. Chávez



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta, Constanza Lecaros Peillard

ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DE MUTANTES DE LA SÍNTESIS DE LOS POLIFOSFATOS EN *PESUDOMONAS AERUGINOSA* UTILIZANDO *DANIO RERIO* COMO MODELO ANIMAL

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dr. Francisco P. Chávez

Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Andrés Marcoleta



Presidente Comisión

Dra. Claudia Stange

Evaluador

Santiago,.....

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los que forman parte tanto del programa de Bachillerato con mención en Ciencias Exactas como de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por entregarme una sólida formación en Ciencias Naturales y un pensamiento crítico en el área, que juntos han sembrado la motivación para investigar y seguir aprendiendo día a día de los fenómenos de la vida. Este proceso implicó largas tardes de estudio, trabajos grupales, asambleas y manifestaciones estudiantiles, muchos recreos de almuerzo y momentos de distracción en el Campus Juan Gómez Milla, que crearon profundos lazos de amistad marcando para siempre mi etapa universitaria. Gracias a Diego von Bernath por ser mi fiel compañero de estudio, cómplice de todo lo vivido y gran amigo.

En especial quiero agradecer al Laboratorio de Microbiología de Sistemas a cargo del Dr. Francisco P. Chávez, por recibirme con las puertas abiertas en el año 2010, hacerme parte de su equipo de trabajo y por darme la libertad y herramientas para incursionar en el área de la Microbiología. A Javiera Ortiz por su paciencia en enseñarme las técnicas básicas de laboratorio e investigación, a Macarena Varas por sus consejos y apoyo, a Nicole Molina por todo su trabajo y esfuerzo, a Javiera Álvarez por su especial compañía y amistad, a Catalina Lafourcade por realizar todos los cruces de pez cebra y a los técnicos del edificio Milenio por su importante trabajo y ayuda en momentos especiales (Oscar, Carlos y Juanito). Cómo no destacar también los seminarios, congresos, almuerzos, asados de laboratorio y todos los buenos momentos que nos hicieron compartir una linda amistad durante mi etapa como investigadora.

Finalmente quiero agradecer profundamente a mi familia, en especial a mis padres, Roxana y Ricardo, por regalarme la oportunidad de vivir esta etapa, darme la libertad de elegir mi camino a seguir y por apoyarme incondicionalmente durante todo este proceso.

Índice de Contenido

I.	Introducción.....	9
	I.i <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
	I.ii Factores de Virulencia en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
	I.iii Polifosfatos.....	11
	I.iv <i>Danio rerio</i> como modelo de estudio.....	13
	I.v Hipótesis y Objetivos.....	14
II.	Materiales y Métodos.....	15
	II.i Cepas Bacterianas.....	15
	II.ii Condiciones de Crecimiento.....	15
	II.iii Cuantificación de Piocinina y Pioverdina	16
	II.iv Estimación de Sideróforos Totales.....	17
	II.v Ensayos de Factores de Virulencia adicionales.....	18
	II.vi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Danio rerio</i>	18
III.	Resultados.....	20
	III.i Efecto de la cantidad de fosfato en el medio sobre la producción de fenotipo.....	20
	III.ii Cuantificación de Piocinina y Pioverdina.....	21
	III.iii Estimación de Sideróforos Totales.....	25
	III.iv Ensayos de Factores de Virulencia adicionales.....	27
	III.v <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Danio rerio</i>	31
IV.	Discusión.....	35
V.	Conclusiones.....	39
VI.	Bibliografía.....	40
VII.	Anexo.....	42

Índice de Tablas y Figuras

Tabla 1: Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 y mutantes generadas por transposición.....	15
Figura 1: Molécula de polifosfato.....	12
Figura 2: Síntesis y degradación de poliP.....	12
Figura 3: Curva de calibración de Píocianina.....	16
Figura 4: Curva de calibración de Pioverdina.....	17
Figura 5: Curvas de calibración Desferal.....	18
Figura 6: Procedimiento experimental para determinar la virulencia de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 en <i>Danio rerio</i>	19
Figura 7: Cultivos celulares de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 bajo condiciones diferenciales de Pi.....	20
Figura 8: Barridos espectrofotométricos en equipo Nanodrop entre 200 y 500 nm.....	21
Figura 9: Cuantificación de Píocianina.....	23
Figura 10: Cuantificación de Pioverdina.....	24
Figura 11: Cuantificación de los equivalentes de Mesilato de Deferoxamina.....	26
Figura 12: Ensayos de producción de factores de virulencia en los medios agar leche, elastina, sangre y CTAB.....	27
Figura 13: Ensayo de factores de virulencia de <i>mutantes de Pseudomonas aeruginosa en la síntesis de polifosfato</i> en agares indicadores específicos.....	29
Figura 14: Ensayo de factores de virulencia de <i>mutantes de Pseudomonas aeruginosa de sideróforos</i> realizados en agares indicadores específicos.	30
Figura 15: Ensayo de factores de virulencia de <i>mutantes de Pseudomonas aeruginosa en la síntesis de piocianina</i>	31
Figura 16: Curvas de sobrevivencia de <i>Danio rerio</i> frente a bacterias mutantes del metabolismo del polifosfato.....	32
Figura 17: Curvas de sobrevivencia de <i>Danio rerio</i> frente a bacterias mutantes de la síntesis de sideróforos	33
Figura 18: Curvas de sobrevivencia de <i>Danio rerio</i> frente a bacterias mutantes de la síntesis de piocianina	34
Figura 19: : Desarrollo del sistema inmune en <i>Danio rerio</i>	37
Figura 20: Curva de calibración de Desferal.....	46

Abreviaturas

FC: Fibrosis Quística

QS: Quorum Sensing

polIP: Polifosfato

Pi: Fosfato inorgánico

PPK1: Enzima Polifosfato Kinasa 1

PPK2: Enzima Polifosfato Kinasa 2

ppk1: Gen codificante para la enzima polifosfato kinasa 1

ppk2: Gen codificante para la enzima polifosfato kinasa 2

ATP: Adenosin Trifosfato

ADP: Adenosin Difosfato

GTP: Guanosin Trifosfato

GDP: Guanosin Difosfato

CTP: Citosin Trifosfato

CTP: Citosin Difosfato

dpf: Días Post Fecundación

wt: cepa silvestre

Resumen

Pseudomonas aeruginosa posee una incidencia en humanos principalmente nosocomial e infecta a pacientes que sufren de Fibrosis Quística (FC), cáncer, quemaduras severas ó a organismos inmunocomprometidos. Posee varias bombas de flujo para multi-drogas que le otorgan una resistencia intrínseca a numerosos antibióticos y desinfectantes. *P. aeruginosa* destaca por poseer múltiples factores de virulencia que han sido estudiados extensivamente bajo condiciones *in vitro*. La infección crónica de este organismo en pacientes con FC provoca un progresivo deterioro pulmonar, deficiencia respiratoria e incluso la muerte.

Los polifosfatos inorgánicos (poliP) son esenciales en el metabolismo bacteriano, y afectan importantes procesos como la virulencia y la comunicación celular. En *Pseudomonas aeruginosa*, la enzima polifosfato kinasa (PPK1) cataliza reversiblemente la síntesis de poliP a partir de ATP, mientras que la PPK2 sintetiza principalmente GTP a partir de poliP. Con el fin de evaluar la virulencia de las mutantes de los genes *ppk1* y *ppk2* derivadas de *P. aeruginosa* PAO1, se ensayó la producción de los siguientes factores de virulencia: pigmentos tóxicos, elastasa, proteasa, ramnolípidos y hemolisina, y se evaluó la letalidad de dichas cepas utilizando larvas de pez cebra como modelo animal. Para esto, se realizaron curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier de las larvas ante distintas bacterias mutantes derivadas de *P. aeruginosa* PAO1, crecidas en medios con alto y bajo fosfato (Pi). Se utilizaron las mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* del metabolismo de los polifosfatos (*ppk1* y *ppk2*) y de la síntesis de pigmentos tóxicos (*pvdF*, *pchF*, *phzM*, *phzS* y *phzR*) en las dos condiciones de Pi.

La cantidad de pioverdina secretada resultó ser significativamente menor en las mutantes *ppk1* y *pvdF* con respecto a la wt, en ambas condiciones de fosfato. En los ensayos de letalidad, solo las cepas *ppk1* y *pvdF* tienen un fenotipo de virulencia atenuado. La producción de los otros factores de virulencia no demostró diferencias significativas entre las cepas bacterianas utilizadas. Se concluye por lo tanto, que de todos los factores de virulencia ensayados, el sideróforo pioverdina sería una de los mas relevantes para causar daño sobre larvas de pez cebra.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa has an incidence in human mainly nosocomial and infects patients suffering from Cystic Fibrosis (FC), cancer, severe burns or immunocompromised bodies. It has several flow pumps for drugs that give intrinsic resistance to many antibiotics and disinfectants. *P.aeruginosa* stands out by producing multiple virulence factors that have been studied extensively in vitro infection. Chronic infection of this organism in patients with FC causes a progressive pulmonary deterioration, respiratory deficiency and death.

The inorganic polyphosphates are essential in bacterial metabolism, and affect important processes such as the virulence and cell communication. In *Pseudomonas aeruginosa*, the enzyme Polyphosphate kinase (PPK1) reversibly catalyzes the synthesis of polyP from ATP, while the PPK2 mainly synthesized GTP from polyP. In order to evaluate the virulence of the mutants of genes *ppk1* and *ppk2* of *P. aeruginosa* PAO1, the production of the following virulence factors were tested: toxic pigments, elastase, protease, surfactants and hemolysin, and the lethality of this strains was tested using Zebra fish as an animal model. For this, Kaplan-Meier survival curves of larvae were done with different bacteria grown in media with high and low phosphate (Pi). The polyphosphates mutants of *Pseudomonas aeruginosa* (*ppk1* and *ppk2*) and the metabolism of toxic pigments (*pvdF*, *pchF*, *phzM*, *phzS* and *phzR*) were used in both conditions of phosphate.

The amount of secreted Pyoverdine was significantly less for mutants *ppk1* and *pvdF* in respect to the wt, under both conditions of phosphate. Only *ppk1* and *pvdF* strains presented an attenuated virulence phenotype for fatality in zebrafish. The production of the others virulence factors didn't result in significantly differences within the strains used. Therefore, it is concluded that within all tested virulence factors, the siderophore pyoverdin would be one of most relevance to cause damage in zebrafish larvae.

I. Introducción

I.i *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram-negativa con la capacidad de adaptarse a una gran variedad de nichos ecológicos (Frimmersdorf y col, 2010), desde suelo y hábitats marinos hasta tejidos animales y vegetales, esto gracias a que puede utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos como fuente nutricional. El metabolismo principal es el catabolismo oxidativo y las fuentes de carbono y nitrógeno son adquiridas preferencialmente a partir de ácidos grasos de cadena corta, aminoácidos y poliaminas. Sin embargo, también puede adquirir carbono de fuentes más complejas como compuestos aromáticos y halogenados (Entner y col, 1951 y Eschbach y col, 2004). Además puede crecer facultativamente en condición anaeróbica mediante la fermentación de arginina, piruvato o con aceptores externos alternativos de electrones (Ginn-Pease y col, 1998 y Goldbourn y col, 2007). Su versatilidad demuestra que es de alta complejidad genética siendo uno de los genomas bacterianos más grandes secuenciados hasta ahora (Stover y col, 2000). Principalmente su incidencia en humanos es nosocomial e infecta a pacientes que sufren de Fibrosis Quística (FC), cáncer, quemaduras severas ó a organismos inmunocomprometidos (Lyczak y col, 2000). Tiene a su favor que posee varias bombas de flujo para multi-drogas que le otorgan una resistencia intrínseca a numerosos antibióticos y desinfectantes. La infección crónica de este organismo en pacientes con FC provoca un progresivo deterioro pulmonar, deficiencia respiratoria e incluso la muerte (Singh y col, 2000).

Pseudomonas aeruginosa ha sido descrita en numerosas ocasiones como un patógeno oportunista, ya que destaca por causar enfermedad en organismos susceptibles a la infección, mientras que su presencia no es dañina en organismos que no lo son, e incluso forma parte de microbiotas naturales. Sin embargo, la clasificación de un microorganismo como patógeno se vuelve bastante más compleja cuando se cuestiona que la virulencia sea algo intrínseco del microorganismo y se acepta que existe una interacción entre el patógeno y el hospedero, lo que determinará la respuesta o daño del hospedero y aquel daño puede ocurrir como resultado de factores microbianos, del hospedero o de ambos. En este contexto, Casadevall y col, 2008 define el término de patogénesis como la capacidad que tiene un microbio de causar daño en un hospedero, mientras que la virulencia es la capacidad relativa que tiene un microbio para causar daño en un hospedero.

I.ii Factores de virulencia en Pseudomonas aeruginosa

Un Factor de Virulencia es un componente microbiano que puede dañar a un hospedero susceptible (Casadevall y Pirofski 2003). *Pseudomonas aeruginosa* destaca por poseer múltiples factores de virulencia que han sido estudiados extensivamente bajo condiciones *in vitro* (Handfield y col, 2000), entre ellos se encuentra la producción de proteasas, adhesinas, exotoxinas, exopolisacáridos, ramnolípido, elastasa, hemaglutinina, sideróforos, fenacinas, pigmentos tóxicos, la formación de biofilms y el sistema de secreción tipo III (Clatworthy y col, 2009). Los efectos asociados a los factores de virulencia son diversos, por ejemplo; la elastasa degrada la matriz extracelular de células epiteliales en vasos sanguíneos (Bejarano y col, 1989) y degrada la elastina del pulmón humano (Yanagihara y col, 2003); mientras que el ramnolípido destruye las células epiteliales y promueve la invasión de *P.aeruginosa* (Zulianello y col, 2006) y se involucra además con la motilidad celular (de tipo swarming) y con la formación de biofilms; y la secreción de toxinas resultan letales para las células del hospedero (Mahajan-Miklos y col, 1999), entre muchos otros. Sin embargo, la producción de factores de virulencia depende de las condiciones ambientales (Scheie y col, 2004) y de la relación patógeno-hospedero, por lo que las investigaciones *in vivo* son cruciales para las aplicaciones terapéuticas. Un ejemplo de esto en *P. aeruginosa* es la disponibilidad de fosfato inorgánico (Pi) en el medio. Cuando *P. aeruginosa* crece en condiciones de bajo fosfato aumenta la producción de factores de virulencia y causa una mayor letalidad en el hospedero (Zaborin y col, 2009; Long y col., 2008). Los ensayos en este seminario se realizarán en presencia y carencia de Pi para modular la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1.

Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro que proveen al organismo de éste nutriente esencial para su crecimiento. *P.aeruginosa* utiliza dos sideróforos para acumular hierro: Pioverdina y Pioquelina. La producción de pioverdina esta regulada por el operon *pvd* y PvdS funciona como factor sigma (Cunliffe y col, 1995). Se ha reportado que mutantes deficientes en la síntesis de pioverdina son menos virulentas en ratón (Meyer y col, 1996). A pesar de que la pioquelina posee una menor afinidad por hierro en comparación con la pioverdina, igualmente juega un rol importante para la virulencia de *P.aeruginosa* (Poole y McKay 2003). Se ha detectado la presencia de pioquelina y pioverdina en pacientes infectados con esta bacteria (Martin y col, 2011).

La Piocianina por otro lado, es un pigmento tóxico producido únicamente por *P.aeruginosa* (Yahr & Parsek 2006) que participa de manera activa en reacciones redox. Inhibe la respiración celular (Hassett y col, 1992), la expresión de catalasa (Lau y col, 2004a), el crecimiento en células

de la epidermis (Wilson y col, 1988) y se ha relacionado estrechamente con la infección pulmonar (Lau y col, 2004b) y la adquisición de hierro (Wilson y col, 1988). Además las membranas biológicas son permeables al pigmento (Lau y col, 2004a).

La virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* está estrechamente relacionada con el sistema de comunicación bacteriana (*Quorum Sensing*: QS) (Van Delden y col, 1998), el cual determina el comportamiento bacteriano mediante moléculas de señalización que permiten la comunicación bacteriana y dependiendo de la densidad de la población, se inducen o reprimen ciertos genes blancos. Este sistema (QS) está involucrado en la colonización (Chun y col, 2004), adhesión, esporulación (Miller & Bassler 2001), formación de biofilm (Davies y col, 1998), y motilidad (Déziel y col, 2003). Se han descrito tres sistemas QS en *Pseudomonas aeruginosa*: las (Passador y col, 1993), rhl (Latifi y col, 1995) y quinolona (PQS: *pseudomonas* quinolone system) (Pesci y col, 1999), que se entrelazan complejamente en sus vías de señalización (Déziel y col, 2005) y regulan la expresión de múltiples factores de virulencia. Por ejemplo, LasR regula la expresión de *rhlR* y la biosíntesis de ramnolípidos (Ochsner & Reiser 1995) y se requiere para la producción de PQS (Pesci y col, 1999). PQS regula la producción de elastasa, ramnolípidos y piocianina (Diggle y col, 2006), pero la síntesis de elastasa es regulada por *lasR* (Passador y col, 1993), mientras que la de ramnolípidos y piocianina por el operon *rhl* (Wagner y col, 2006a).

Mediante el sistema de secreción tipo III, *P. aeruginosa* secreta sus toxinas dentro de las células del hospedero (Tomassen y col, 1992) y se ha reportado que su expresión es inducida luego de contacto con células eucarióticas (Shen y col, 2008) y que causa apoptosis de células epiteliales (Hauser & Engel 1999).

I.iii Los polifosfatos inorgánicos

Los polifosfatos inorgánicos (poliP) son biopolímeros lineales de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido de alta energía (Kornberg y col, 1999). La función de ésta macromolécula se asocia con almacenar fosfato inorgánico (Pi) y ser una reserva de energía. Sin embargo, se ha relacionado también con diversas funciones celulares y estructurales entre las cuales se encuentra la adaptación a ambientes extremos, crecimiento celular, respuesta al estrés, comunicación, formación de biopelículas y virulencia (Varela y col, 2009).

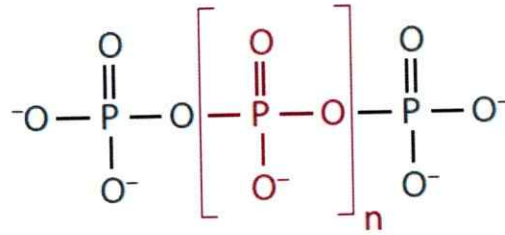


Figura 1. Molécula de polifosfato. Los residuos de ortofosfatos pueden ser desde decenas a centenas y el valor de n varía dependiendo del tipo de célula y el estado en que se encuentre.

La síntesis del poliP en bacterias está mediada por la enzima polifosfato quinasa 1 (PPK1), que cataliza reversiblemente la síntesis de poliP a partir de ATP; y la enzima polifosfato quinasa 2 (PPK2), que cataliza reversiblemente la fosforilación de GDP a partir de poliP (Achbergerová y col, 2011). También pueden utilizar otros nucleótidos, como UTP y CTP, pero con menor afinidad que los mencionados y a pesar de ser ambas reacciones reversibles, cada una posee un desplazamiento favorable hacia la síntesis o degradación de poliP respectivamente (Figura 2). Se ha reportado que las enzimas PPK están altamente conservadas en muchas especies procariontes las cuales pueden poseer ambas enzimas o sólo una de ellas (Zhang y col, 2002).

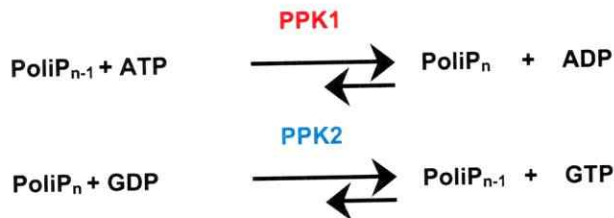


Figura 2: Síntesis y degradación de poliP. PPK1 cataliza reversiblemente la síntesis de poliP a partir de ATP (ATP > GTP > UTP > CTP), mientras que PPK2 cataliza reversiblemente la fosforilación de GDP a partir de poliP (GDP > ADP).

Mutantes del gen *ppk1* derivadas de *P.aeruginosa* han demostrado defectos en la motilidad, adhesión y la envoltura celular. Además de un déficit en la producción de factores de virulencia, exopolisacárido y de moléculas autoinducturas. Es por esto que la virulencia, formación de biopelículas y comunicación QS se encuentran alteradas en esta mutante. Por otra parte, su letalidad se ha reportado disminuida en modelo de ratón con quemaduras severas (Rashid y col, 2000) y su virulencia es atenuada en los modelos biológicos de pez cebra (*Danio rerio*), el nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Zaborin, A., 2009) y la ameba *Dictyostelium discoideum* (Bravo, C., 2015).

En cuanto a la enzima PPK2 se ha reportado que su actividad aumenta notablemente durante la fase estacionaria de crecimiento bacteriano, etapa en la cual se sintetiza el exopolisacárido alginato a partir del GTP producido y que es esencial para la virulencia de

P.aeruginosa (Roychoudhury y col, 1992). Sin embargo no se conocen los fenotipos asociados a la carencia de PPK2 en *P. aeruginosa* ni en otras bacterias que contengan tanto PPK1 como PPK2.

I.iv Danio rerio como modelo de estudio

Danio rerio es un pez de agua dulce, conocido como pez cebra y es considerado un excelente modelo de estudio por poseer diversas ventajas. Entre ellas se encuentra su sencilla reproducción, crianza y mantención en el laboratorio. Además su tiempo generacional es corto y produce una numerosa progenie. El huevo destaca por ser transparente, permitiendo una amigable visualización y manipulación, lo cual ha posibilitado un gran aprendizaje en el ámbito de la Biología del Desarrollo y de la patogénesis *in vivo*. Su genoma está completamente secuenciado, por lo que la obtención de distintos tipos de mutantes es bastante asequible. Presenta una inmunidad tanto innata como adquirida, que se desarrollan en desfase durante el desarrollo del pez, lo cual permite realizar diversos estudios inmunológicos y mas aún relacionarlos con el sistema inmune de mamíferos. Gracias a que posee sistemas únicos de interacción patógeno-hospedero y que muchos patógenos humanos poseen una baja especificidad de especie y pueden infectar a una gran variedad de hospederos (Kurz y col, 2007), ha sido ampliamente utilizado para estudiar la virulencia de patógenos humanos *in vivo*.

En etapas tempranas del desarrollo embrionario del pez hay presencia de un sistema inmune innato que se compone de macrófagos primitivos que son fagocíticamente activos luego del primer día post fecundación (1dpf), neutrófilos que producen mieloperoxidasa (actividad microbicida) luego de 2dpf y linfoblastos inmaduros (precursores de células T) a los 5 dpf. El sistema adaptativo por otro lado, alcanza la maduración (respuesta de células T y B) luego de 2 a 4 semanas post fecundación (Meeke y col, 2008).

Danio rerio se ha utilizado anteriormente como modelo de infección con *P.aeruginosa* PAO1 mediante inyección directa de la bacteria al torrente sanguíneo o mediante la incubación de ambos (Inmersión estática) (Ortíz-Severín, J., 2012), siendo del segundo método menos invasivo para el pez el cual genera una menor mortalidad (Bates y col, 2006).

En resultados previos de nuestro laboratorio con el método de inmersión demostramos una virulencia diferencial de las cepas *ppk1* y *ppk2* de *P. aeruginosa* PAO1 (Ortíz-Severín, J., 2012). Es decir, confirmamos el fenotipo de virulencia atenuado de la mutante *ppk1* observado en otros modelos murinos y en contraste encontramos un fenotipo hipervirulento de la mutante *ppk2*. Las causas de esta diferencia en la virulencia entre ambas mutantes no está del todo claro y para



evaluarlo sería necesario estudiar la expresión de diferentes factores de virulencia en dichas mutantes.

I.v Hipótesis y Objetivos

La hipótesis del presente seminario es que “La diferencia en la virulencia sobre el pez cebra observada en las cepas *ppk1* y *ppk2* de *Pseudomonas aeruginosa*, se debe a la expresión diferencial de sideróforos y pigmentos tóxicos”.

El objetivo general del presente seminario es estudiar la virulencia de las cepas mutantes del metabolismo de los poliP y de la síntesis de los sideróforos y pigmentos tóxicos derivadas de PAO1, bajo condiciones de crecimiento diferenciales de fosfato, utilizando *Danio rerio* como modelo animal *in vivo*.

Los objetivos específicos son:

1. Estimar la producción de sideróforos totales y cuantificar los pigmentos tóxicos, piocianina y pioverdina, de los mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* del metabolismo de los polifosfatos (*ppk1* y *ppk2*) y de los pigmentos tóxicos (*pvdF*, *pchF*, *phzM*, *phzS* y *phzR*) en condiciones de carencia y abundancia de fosfato.
2. Ensayar la producción de factores de virulencia (actividad de proteasas, elastasa, hemolisina y ramnolípido) de los mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* del metabolismo de los polifosfatos y pigmentos tóxicos en ausencia y presencia de fosfato en el medio.
3. Determinar la letalidad sobre larvas de *Danio rerio* causada por los mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* en la síntesis de polifosfato y pigmentos tóxicos, luego de crecer en condiciones de alto y bajo fosfato.

II. Materiales y Métodos

I.i Cepas bacterianas

La cepa bacteriana utilizada es *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 junto a una serie de mutantes por transposición generadas a partir de la misma (Tabla 1). Se utilizaron dos mutantes del metabolismo del polifosfato inorgánico (*ppk1* y *ppk2*), dos mutantes de la producción de sideróforos (*pvdF* y *pchF*) y tres mutantes de la vía de síntesis del pigmento pircianina (*phzR*, *phzM* y *phzS*). Todas las cepas fueron obtenidas mediante la librería comercial *Pseudomonas* Genome Database disponible en: www.pseudomonas.com (Jacobs y col, 2003).

Tabla 1: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* utilizadas en este estudio.

Cepas	Descripción
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
PAO1	Cepa silvestre
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)
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)
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)
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)
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)
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)
PW4325	Cepa mutante <i>phzR</i> . Derivada de PAO1 con inserción de un cassette de resistencia a tetraciclina (Mini-Tn5-Tet ^r) en el gen <i>phzR</i> (PA1898)

I.ii Condiciones de crecimiento bacteriano

Las cepas bacterianas de *P. aeruginosa* fueron crecidas a modo de pre-cultivos en medio Luria-Bertani (LB Difco, 20g/l) suplementado con el antibiótico tetraciclina (50 µg/ml) para todas las cepas mutantes. Los cultivos de *P. aeruginosa* fueron inoculados en una razón de 100:1 con los pre-cultivos de noche, que previamente, se lavaron dos veces con medio PGS descartando el sobrenadante en cada ocasión (8000g por 5 min a temperatura ambiente). A continuación, los

cultivos fueron incubados durante 18 horas a 37°C y 180 rpm bajo condiciones de alto y bajo fosfato, utilizando los medios PGS alto Pi (3 g/l NaCl, 2% glicerol, 2,5 g/l peptona, 25 ml/l de Tampón K-pH 1M (KH₂PO₄ 1M y se agrega K₂HPO₄ 1M hasta alcanzar pH=6), CaCl₂ 1 mM, y MgSO₄ 1 mM. pH=6) y PGS bajo Pi (3 g/l NaCl, 20 ml/l glicerol, 2,5 g/l peptona, CaCl₂ 1 mM y MgSO₄ 1 mM. pH=6) respectivamente.

L.iii Cuantificación de pigmentos tóxicos

Para la cuantificación de los pigmentos tóxicos se realizó un barrido espectrofotométrico entre 200 y 500 nm utilizando el sideróforo comercial pioverdina y el pigmento comercial piocinina (SIGMA), con el fin de estimar los picos de absorción de cada compuesto bajo condición de alto y bajo fosfato. Además, se realizaron curvas de calibración para cada uno de los compuestos comerciales (de 0 a 15 µg/ml para piocinina y de 0 a 100 µg/ml para pioverdina) con el fin de cuantificar estos componentes en el sobrenadante bacteriano. Para esto, se utilizó la ecuación de la recta de la regresión lineal de cada una de las curvas de calibración (Figura 3 y 4). El sobrenadante de los cultivos celulares, crecidos en medio PGS alto Pi y bajo Pi durante 18hrs, fue filtrado mediante 0,22 µm y guardado a -20°C para mediciones de absorbancia (Synergy 2, BioTek). La absorbancia fue medida a 311 nm con el fin de cuantificar el pigmento piocinina en ambos medios de Pi, mientras que a 383 y 386 nm se cuantificó al sideróforo pioverdina en las condiciones de alto y bajo Pi respectivamente. Las muestras fueron diluidas para los valores de absorbancia mayores a la unidad. Se midieron cuatro replicas biológicas de muestras de sobrenadantes para ambas condiciones de crecimiento, resultando en ocho muestras para cada cepa bacteriana de *P. aeruginosa*.

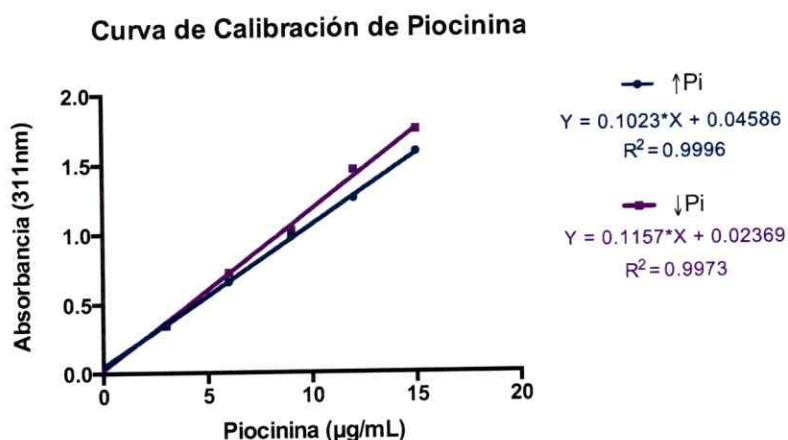


Figura 3: Curva de calibración de Piocinina. La absorbancia a 311 nm fue medida en función de la concentración del pigmento comercial piocinina (que varió de 0 a 15 µg/ml) y fue disuelto en los medios PGS alto Pi ($y = 0,102x + 0,046$) y PGS bajo Pi ($y = 0,116x + 0,024$) de manera independiente, ajustando de manera lineal cada situación.

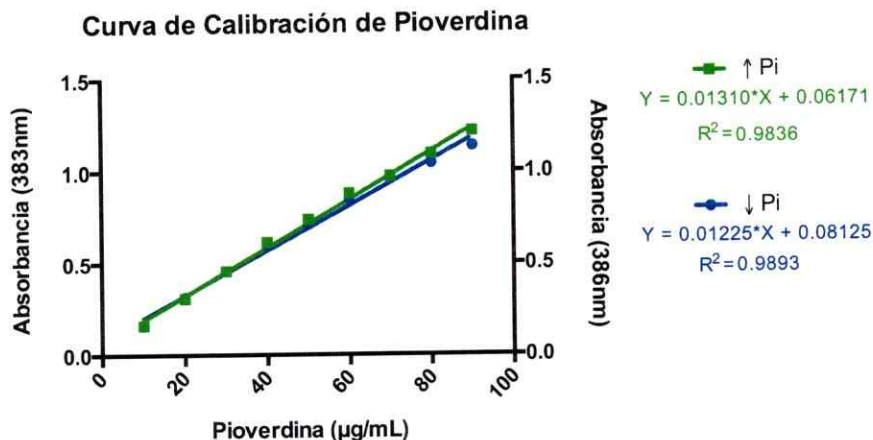


Figura 4: Curva de calibración de Pioverdina. La absorbancia a 383 y 386 nm fue medida en función de la concentración del pigmento comercial pioverdina (que varió de 0 a 100 $\mu\text{g/ml}$) y fue disuelto en los medios PGS alto Pi ($y = 0,013x + 0,062$) y PGS bajo Pi ($y = 0,013x + 0,081$) de manera independiente, ajustando de manera lineal cada situación.

I.iv Estimación de los sideróforos totales

Para la estimación de los sideróforos totales se utilizó el agar CAS que se preparó según lo descrito por Shin y col ,2001 y se distribuyó en placas de Petri (90 mm) con 25 ml cada una. Una vez gelificado el agar, se perforó cada placa con seis agujeros de 0,5 cm de diámetro aproximadamente. Se realizó una curva de calibración con ajuste lineal, utilizando 50 μl por pocillo del sideróforo comercial Mesilato de Deferoxamina (Desferal) en un rango de concentración de 0,1 a 1 mM en los medios PGS alto y bajo Pi (Figura 5). El sobrenadante de cada uno de los cultivos celulares, crecidos en medio PGS alto Pi y bajo Pi durante 18 h, fue filtrado mediante filtros de 0,22 μm para el ensayo de difusión en agar CAS (CASDA). Se vertieron 50 μl de sobrenadantes (en duplicado) en cada uno de los agujeros de la placa con agar CAS y se realizaron cinco replicas biológicas. Luego de 24-48 hrs de incubación a temperatura ambiente, se midieron los diámetros de los halos amarillos alrededor de los agujeros (anexo). Mediante la ecuación de la recta de la curva de calibración, se calcularon los equivalentes de Desferal para todos los sobrenadantes ensayados (Figura 5).

Curva de Calibración Desferal

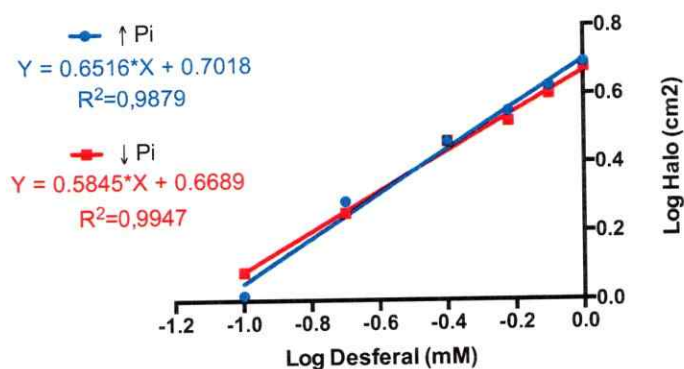


Figura 5: Curvas de calibración Desferal. La concentración de desferal varió de 0,1 a 1mM y fue disuelto en los medios PGS alto Pi ($y = 0,65x + 0,70$) y PGS bajo Pi ($y = 0,59x + 0,67$) de manera independiente, ajustando de manera lineal cada situación.

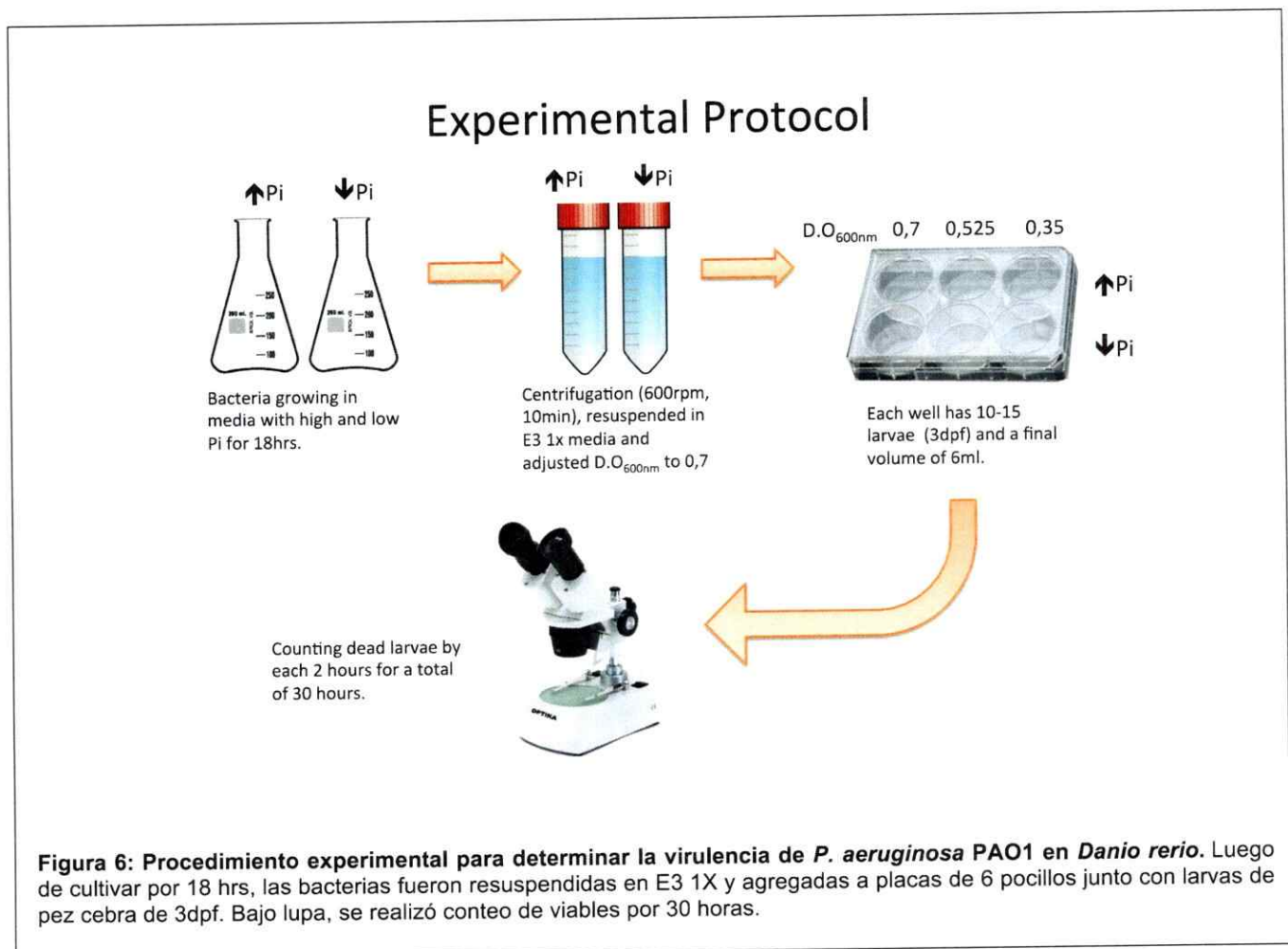
I.v Ensayos de factores de virulencia adicionales

Los ensayos para factores de virulencia se realizaron mediante el estudio de las actividades de proteasas, hemolisina, elastasa y ramnolípidos, ensayadas en los medios indicadores de agar leche (Difco), sangre (Biomerieux), elastina y CTAB respectivamente. Todos los medios fueron distribuidos en placas de Petri (90 mm) con 25 ml cada una, a excepción del medio elastina que fue distribuido en placas de Petri (55 mm) con 5 ml cada una. Se inocularon 5 μ l de los cultivos de *P. aeruginosa* PAO1, crecidos en alto y bajo fofato, directamente en los medios de agar mencionados. Cada ensayo se incubó a 37°C durante 24-48 horas y se midieron los halos de degradación alrededor de las colonias bacterianas en proporción al diámetro de la colonia respectiva. Todas las cepas de la Tabla 1 fueron ensayas en al menos tres de los medios mencionados y los ensayos se llevaron a cabo con cinco replicas biológicas. Mediante el programa computacional GraphPad Prism 6, se realizaron los gráficos de columnas con análisis estadístico ANOVA de una vía y comparaciones múltiples de todas las cepas mutantes contra la cepa silvestre.

I.vi Ensayos de letalidad de Pseudomonas aeruginosa en Danio rerio

Entre las cepas bacterianas utilizadas de *P. aeruginosa* se encuentran la cepa silvestre, PAO1 wt, las cepas mutantes del metabolismo de los polifisfatos, *ppk1* y *ppk2*, las de producción de sideróforos, *pvdF* y *pchF*, y las de síntesis de pocianina, *phzM*, *phzR* y *phzS*. La letalidad provocada por estas bacterias a larvas de pez cebra fue analizada bajo condiciones de crecimiento en alto y bajo fofato. Los cultivos bacterianos, crecidos en medio PGS alto Pi y PGS bajo Pi, fueron centrifugados (a 25°C y 6000 rpm por 10 min), se descartó el sobrenadante y se

resuspendieron los precipitados bacterianos en medio E3 1X (E3 50X: 14,33 g/l NaCl, 0,63 g/l KCl, 2,24 g/l CaCl₂ y 4,08 g/l MgSO₄·7H₂O, pH=7). Por otro lado, los peces fueron incubados a 28°C en medio E3 1X hasta alcanzar los 3 días post-fecundación (3dpf), sin embargo durante el experimento fueron mantenidos a 22°C. Cada cepa bacteriana fue agregada en tres densidades ópticas (0,7 , 0,525 y 0,35) a grupos de 10 a 15 peces y se contaron los individuos muertos bajo la lupa cada dos horas, hasta un total de 30 horas (Figura 6). Mediante el programa computacional GraphPad Prism 6, se graficaron las curvas de sobrevivencia de Kaplan-Meier y el análisis estadístico se basó ANOVA de una vía y en comparaciones múltiples de todas las cepas mutantes contra la cepa silvestre.



III. Resultados

I.i Efecto de la cantidad de fosfato en el medio sobre la producción de fenotipo de mutantes de P. aeruginosa

P. aeruginosa PAO1 y sus mutantes derivadas fueron crecidas por 18 hrs con distinta cantidad de Pi. En condición de bajo Pi, los cultivos celulares presentaron una variedad de fenotipos con colores intensos y variables, mientras que en la condición opuesta todas las cepas presentaron un fenotipo semejante, de carácter opaco y blanquecino en general (Figura 7). Se observa claramente que la carencia de fosfato estimula la producción de pigmentos en todos los casos. Es interesante notar ciertas semejanzas de fenotipo entre algunas de las cepas mutantes frente a la carencia de fosfato, resultando un color azul para *ppk1* y *pvdF*, amarillo brillante para la cepa silvestre y la mutante *phzM* y verde para *ppk2*, *pchF* y *phzR*. La mutante *phzS* fue la única en presentar un color café en esta condición.

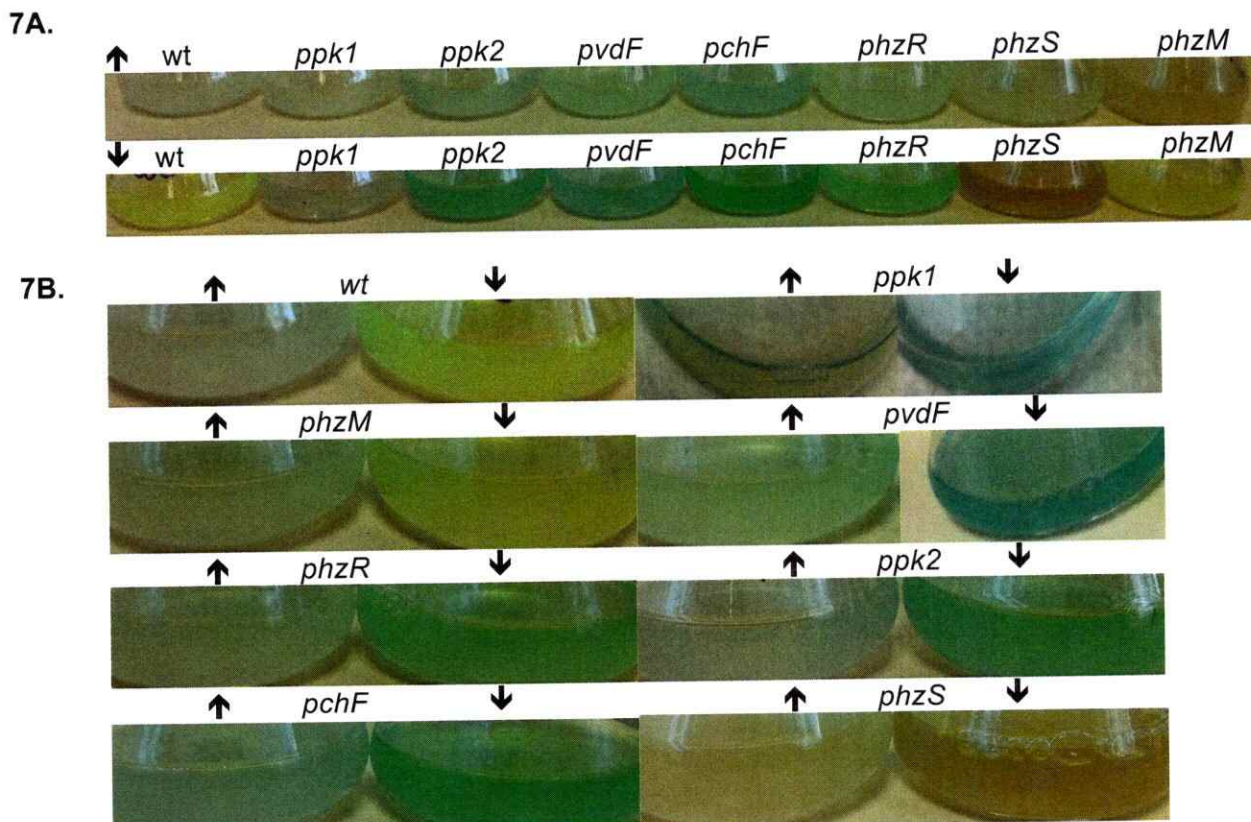


Figura 7: Cultivos celulares de *P. aeruginosa* bajo condiciones diferenciales de Pi, incluyendo a la cepa silvestre PAO1, dos mutantes del metabolismo del polifosfato inorgánico (*ppk1* y *ppk2*), dos de la producción de sideróforos (*pvdF* y *pchF*) y tres relacionados con la producción del pigmento piocianina (*phzR*, *phzM* y *phzS*). (A) Cultivos celulares crecidos en medio PGS Alto Pi (↑) y PGS Bajo Pi (↓). (B) Mediante flechas se distingue el crecimiento en medio PGS Alto Pi (↑) y PGS Bajo Pi (↓) para cada cepa bacterianas utilizada.

1.ii Cuantificación de pioverdina y piocianina en los mutantes de Pseudomonas aeruginosa en la síntesis de polifosfato y pigmentos tóxicos

Con vistas a cuantificar la producción de los pigmentos tóxicos pioverdina y piocianina, se midieron los picos de absorción de los respectivos compuestos comerciales y el medio PGS respectivo se utilizó como blanco para cada condición de fosfato. Obteniéndose para la pioverdina un máximo a los 386 nm en la condición de alto Pi y 383 nm para la de bajo Pi (Figura 8A), mientras que para la piocianina, se obtuvo 311 nm en ambas condiciones (Figura 8B). Según esto, se realizó una curva de calibración de la medición de la absorbancia en función de la concentración de cada compuesto comercial y se ajustaron en base a un comportamiento lineal. El rango de concentración medido de piocianina fue 0 a 15 µg/ml, mientras el de pioverdina fue entre 0 y 100 µg/ml a 386 y 383 nm respectivamente (Figura 3 y 4).

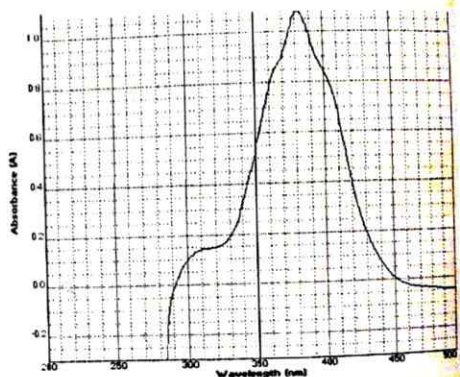
Para cuantificar los pigmentos piocianina y pioverdina producidos por cada cepa bacteriana luego de ser crecidas en condición de alto y bajo fosfato, se midió la absorbancia de todos los sobrenadantes de los cultivos bacterianos a longitudes de onda de 311, 383 y 386nm. Para los valores de absorbancia mayores a la unidad, se realizó la dilución adecuada. Se graficó la absorbancia en función de la concentración de cada pigmento tóxico y mediante estas curvas de calibración se calculó la cantidad de cada uno.

La deficiencia de fosfato en el crecimiento bacteriano resultó en un notable aumento de piocianina por parte de la cepa silvestre (wt), las mutantes del metabolismo de poliP (*ppk1* y *ppk2*) y de la síntesis de sideróforos (*pvdF* y *pchF*) en comparación con la condición de alto fosfato respectiva (Figura 9A y 9B). En condiciones de bajo Pi, la cepa PAO1 wt produce casi tres veces mas piocianina con respecto al cultivo de alto Pi. Es interesante destacar que las cepas *ppk1* y ambas mutantes de sideróforos producen una menor cantidad del pigmento en presencia de fosfato respecto a la wt y no así la cepa *ppk2*. Sin embargo, en bajo Pi ninguna de estas cuatro cepas se diferencia significativamente de PAO1 wt.

En cuanto a las mutantes implicadas en la ruta síntesis de piocianina (*phzM*, *phzS* y *phzR*), la cantidad de este pigmento no es afectada en alto Pi, mientras que se ve disminuida significativamente en comparación con la cepa silvestre en la condición de bajo Pi (Figura 9C).

8A.

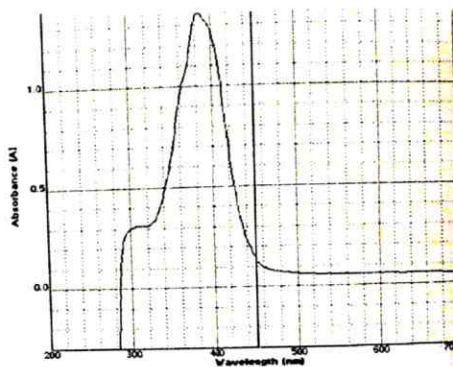
↑ Pi



Peak	Absorbance
nm	A
383	1.081

Cursor	Absorbance
nm	A
350	0.519

↓ Pi

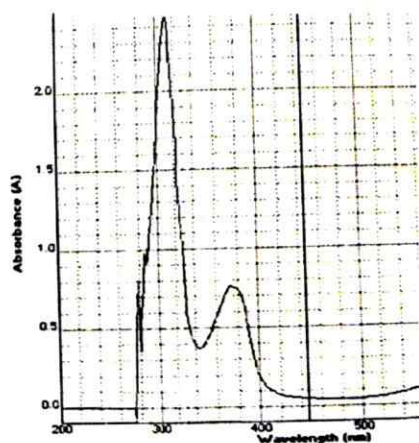


Peak	Absorbance
nm	A
386	1.360

Cursor	Absorbance
nm	A
450	0.144

8B.

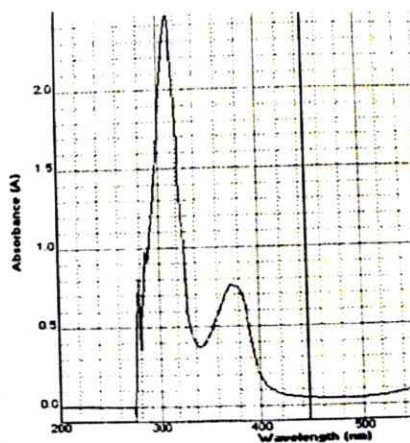
↑ Pi



Peak	Absorbance
nm	A
311	2.459
374	0.763

Cursor	Absorbance
nm	A
447	0.050

↓ Pi



Peak	Absorbance
nm	A
311	2.459
374	0.763

Cursor	Absorbance
nm	A
447	0.050

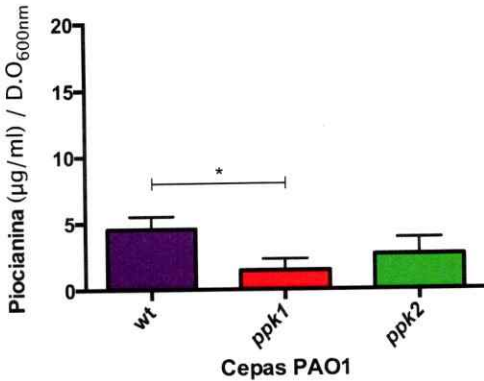
Figura 8: Barridos espectrofotométricos en equipo Nanodrop entre 200 y 500 nm. Los máximos de absorción para los compuestos comerciales fueron de 383 nm para la condición de alto Pi y 386 nm para la de bajo Pi en el caso de piovredina (A), mientras 311 nm resultó para ambas condiciones de fosfato para piovredina (B).

Por otro lado, la cantidad del sideróforo pioverdina se encuentra disminuido significativamente con respecto a la cepa silvestre por parte del mutante *ppk1* en ambas condiciones de fosfato, mientras que la mutante *ppk2* resultó tener menor cantidad de pioverdina sólo en presencia de Pi (Figura 10A). De la misma manera que *ppk1*, la mutante *pvdF* produce menos pioverdina que PAO1 wt bajo ambas condiciones de crecimiento. La mutación genética *pvdF* está implicada en la síntesis del sideróforo en cuestión, por lo que dicho resultado era esperable para este mutante (Figura 10B). Por su parte, el mutante *pchF* no mostró diferencias significativas con la cepa wt en ninguna de las condiciones de Pi y más aun fue la cepa con el comportamiento más semejante a la cepa silvestre en cuanto a la cantidad de pioverdina producida.

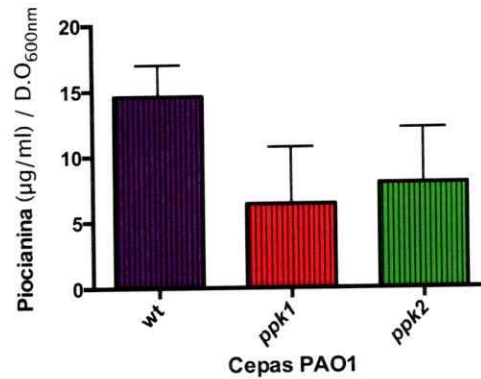
Finalmente, en las mutantes implicadas en la ruta síntesis de piocianina (*phzM*, *phzS* y *phzR*), la cantidad de pioverdina es menor en la cepa *phzR* en comparación con la wt en ambas condiciones de Pi, mientras que para la cepa *phzM* es menor solo en bajo Pi. La mutante *phzS* en cambio, no presenta diferencia significativa con respecto a la cepa silvestre en ninguna de las condiciones de Pi (Figura 10C).

9A. Mutantes de poliP

Cuantificación de Piocianina ↑Pi

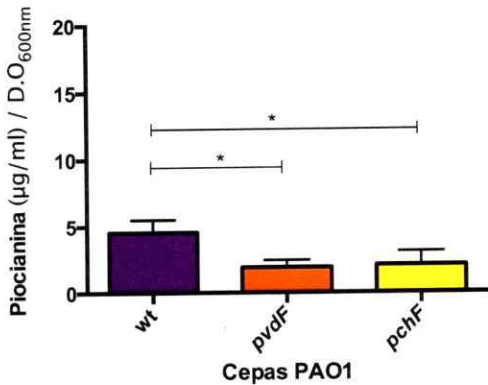


Cuantificación de Piocianina ↓Pi

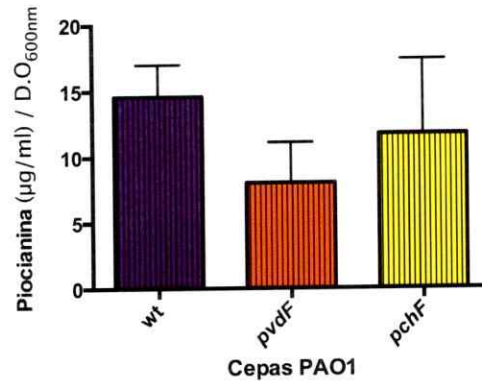


9B. Mutantes de sideróforos

Cuantificación de Piocianina ↑Pi

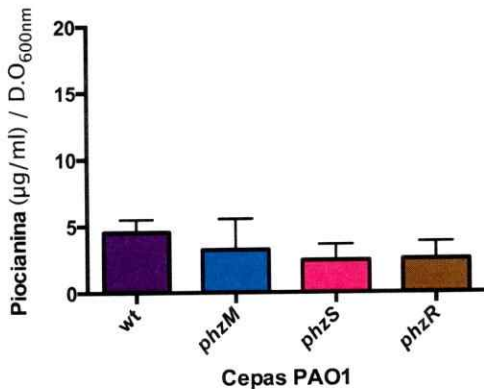


Cuantificación de Piocianina ↓Pi



9C. Mutantes de Piocianina

Cuantificación de Piocianina ↑Pi



Cuantificación de Piocianina ↓Pi

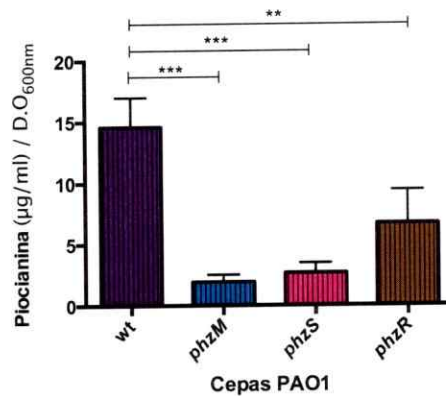
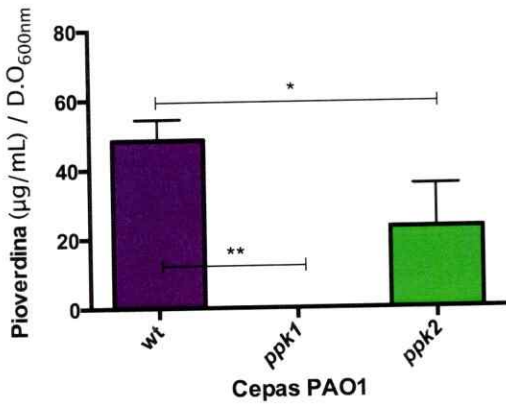


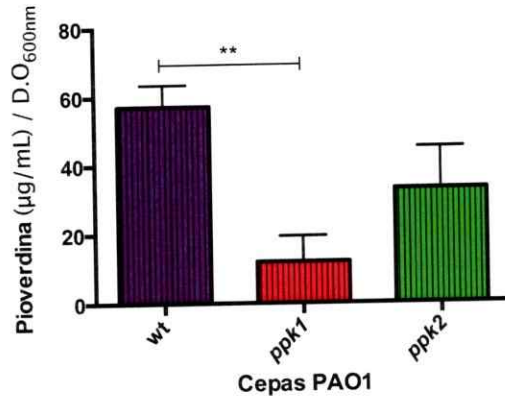
Figura 9: Cuantificación de Piocianina. Cuantificación de piocianina en cultivos celulares *Pseudomonas aeruginosa*, incluyendo la cepa silvestre, (A) mutantes del metabolismo del polifosfato inorgánico (*ppk1* y *ppk2*), (B) de la producción de sideróforos (*pvdF* y *pchF*) y (C) de la producción del pigmento piocianina (*phzR*, *phzM* y *phzS*). Los gráficos de barra representan el promedio de piocianina ajustado a la D.O._{600nm} de cada cultivo celular y con la desviación estándar de cada caso, N=4.

10A. Mutantes de poliP

Cuantificación de Pioverdina ↑Pi

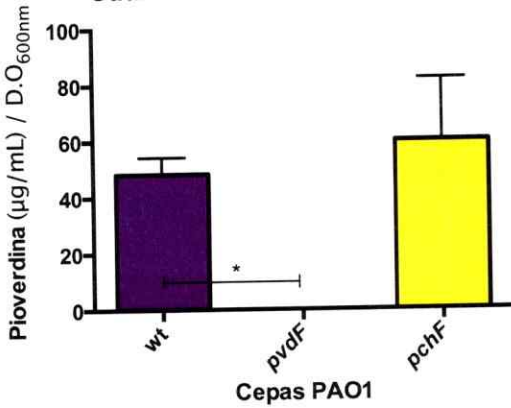


Cuantificación de Pioverdina ↓Pi

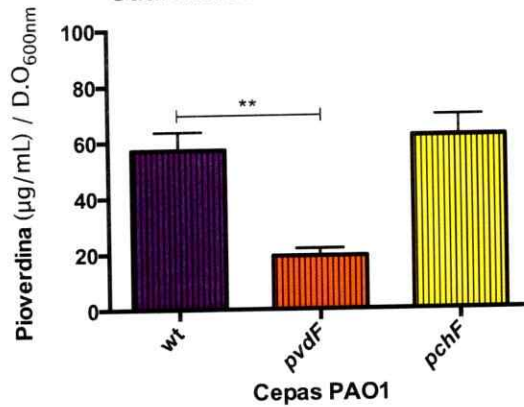


10B. Mutantes de sideróforos

Cuantificación de Pioverdina ↑Pi

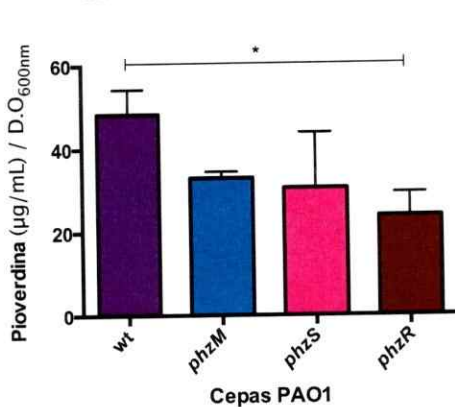


Cuantificación de Pioverdina ↓Pi



10C. Mutantes de Piocianina

Cuantificación de Pioverdina ↑Pi



Cuantificación de Pioverdina ↓Pi

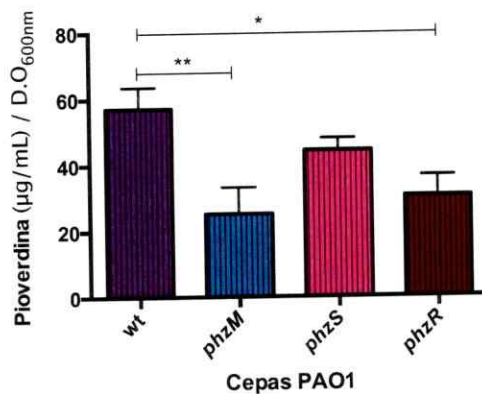


Figura 10: Cuantificación de la Pioverdina en cepas mutantes de *P. aeruginosa* PAO1. Se muestra la cuantificación de pioverdina en cultivos celulares de *Pseudomonas aeruginosa*, entre ellos el de la cepa silvestre, (A) mutantes del metabolismo del polifosfato inorgánico (*ppk1* y *ppk2*), (B) de la producción de sideróforos (*pvdF* y *pchF*) y (C) de la producción del pigmento piocianina (*phzR*, *phzM* y *phzS*). Los gráficos de barra representan el promedio de pioverdina ajustado a la D.O._{600nm} de cada cultivo celular y la desviación estándar de cada caso, N=4.

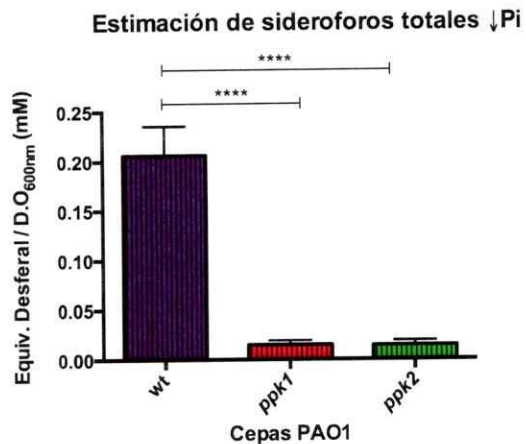
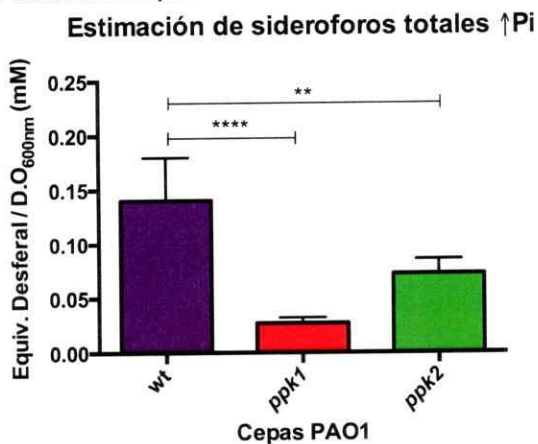
L.iii Estimación de los sideróforos totales en los mutantes de Pseudomonas aeruginosa en la síntesis de polifosfato y pigmentos tóxicos

Para tener una estimación de la producción total de sideróforos en las distintas mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en la síntesis de polifosfato y pigmentos tóxicos, a partir de los diámetros de los halos generados por el Desferal en agar CAS, se realizó una curva de calibración en función de su concentración (rango de 0,1-1mM) en los medios alto y bajo fosfato de manera independiente (Figura 5). En base al trabajo de Shin y col, 2001, se calculó el logaritmo de cada variable (Diámetro Halo vs. Concentración de Desferal) y cada condición de Pi, se ajustó al comportamiento lineal. Los halos generados por parte del compuesto comercial y la cepa silvestre (PAO1 wt), se muestran en Anexo. La ecuación de la recta de cada curva de calibración, fue utilizada para estimar los equivalentes de desferal para cada uno de los sobrenadantes bacterianos de *P.aeruginosa* PAO1 ensayados en agar CAS (Figura 11).

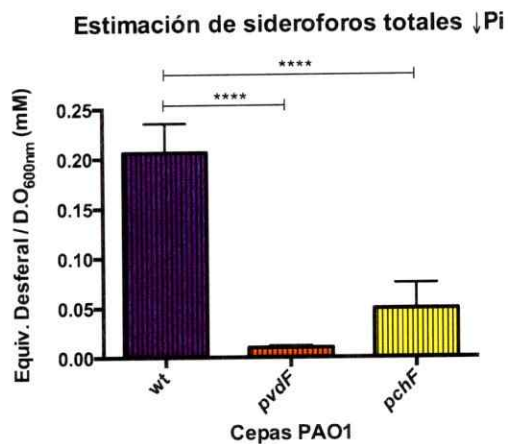
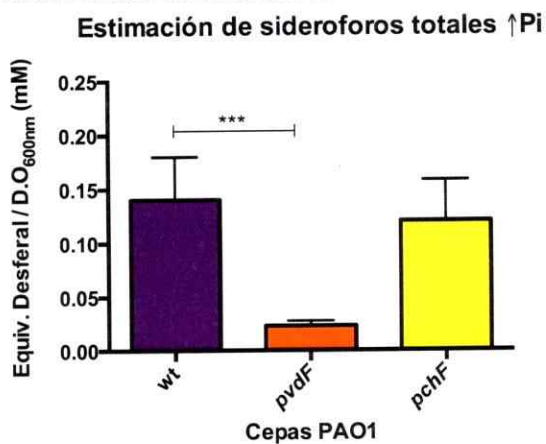
Los secretomas de todas las cepas mutantes crecidas en carencia de Pi, resultaron tener una menor cantidad de sideróforos totales con respecto a la cepa control (PAO1 wt). Para la condición de alto Pi, sólo las mutantes *pchF* y *phzM* no presentan una diferencia significativa con respecto a la wt (Figura 11B y 11C) y ambos niveles de sideróforos totales es bastante semejante al de la cepa silvestre. Esto coincide con el resultado de la cuantificación de pioverdina (Figura 10) para estas cepas. Al comparar ambas condiciones de Pi, todas las cepas ensayadas demostraron una mayor estimación de sideróforos totales en alto Pi, mientras que la cepa silvestre aumentó levemente los niveles de los compuestos quelantes de hierro en bajo Pi.

En cuanto a las mutantes de poliP, se estimó que el mutante *ppk2* produce alrededor del doble de sideróforos que el mutante *ppk1* en presencia de Pi (Figura 11A). Cabe destacar la diferencia aún mas drástica que hay en los resultados entre las mutantes de la producción de sideróforos (*pvdF* y *pchF*), estimándose menos sideróforos totales para la mutante *pvdF* en ambas situaciones de Pi, al menos dos veces menor en bajo Pi y tres veces en alto Pi (Figura 11B). La mutante para la síntesis de pioverdina presenta semejante estimación de sideróforos producidos que la mutante de poliP *ppk1* en ambas condiciones de Pi.

11A. Mutantes de poliP



11B. Mutantes de Sideroforos



11C. Mutantes de Píocianina

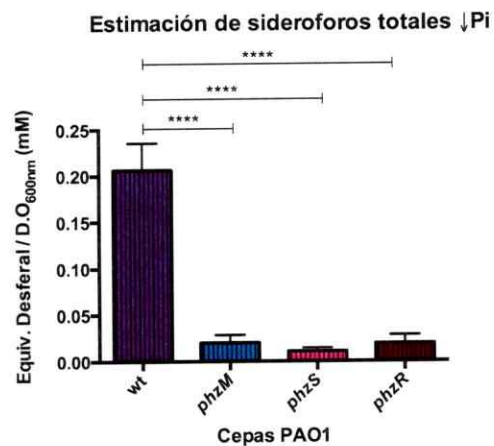
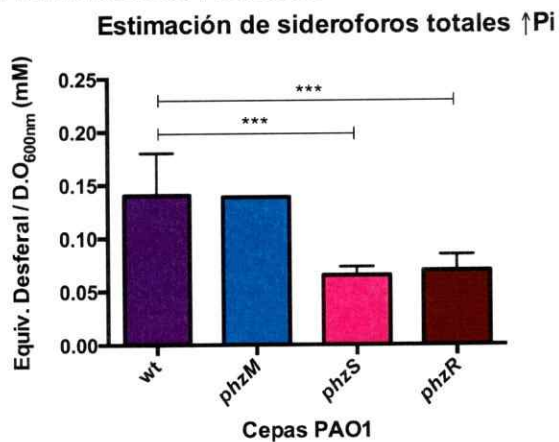


Figura 11: Cuantificación de los equivalentes de Mesilato de Deferoxamina (mM) bajo condición de alto y bajo fósforo para cultivos celulares de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, incluyendo la cepa silvestre (wt) y las mutantes (A) del metabolismo del polifosfato inorgánico (*ppk1* y *ppk2*), (B) de la producción de sideróforos (*pvdF* y *pchF*) y (C) de la producción del pigmento píocianina (*phzR*, *phzM* y *phzS*). N=5.

I.iv Ensayos de factores de virulencia adicionales en las mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* en la síntesis de polifosfato y pigmentos tóxicos

Pseudomonas aeruginosa produce una gran cantidad de factores de virulencia, algunos de los cuales su producción puede ser detectada en agares específicos (Figura 12). En este trabajo determinamos las actividades proteasa, hemolisina, elastasa y ramnolípidos en los medios agar leche, sangre, elastina y CTAB, respectivamente. Los halos de degradación generados por PAO1 wt en los cuatro medios selectivos se exponen en la Figura 12. Los diámetros de estos halos fueron medidos y estandarizados en base a los diámetros de las colonias bacterianas ($D_{halo}/D_{colonia}$) respectivas.

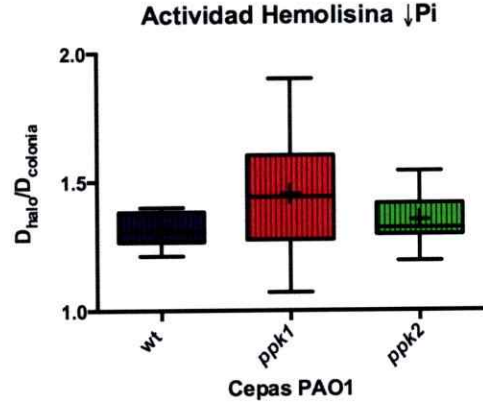
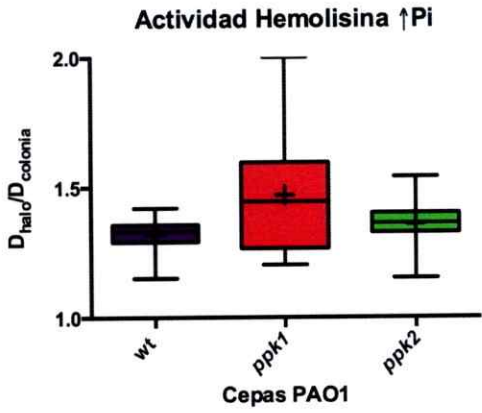
Actividad	Proteasa	Elastasa	Hemolisina	Ramnolípidos
↑ Pi				
↓ Pi				

Figura 12: Ensayos de producción de factores de virulencia en los medios agar leche, elastina, sangre y CTAB (izquierda a derecha) luego de ser crecida bajo condición de alto y bajo fosfato (↑Pi y ↓Pi). Mediante una barra se indica el grosor del halo.

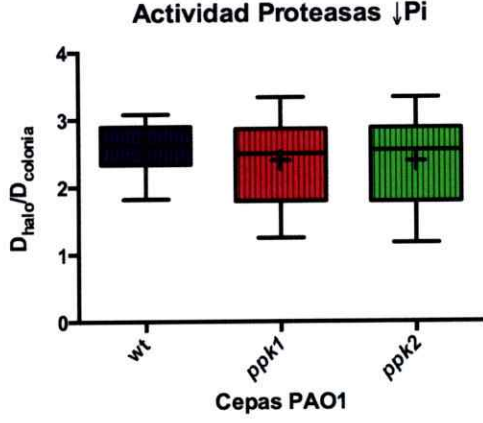
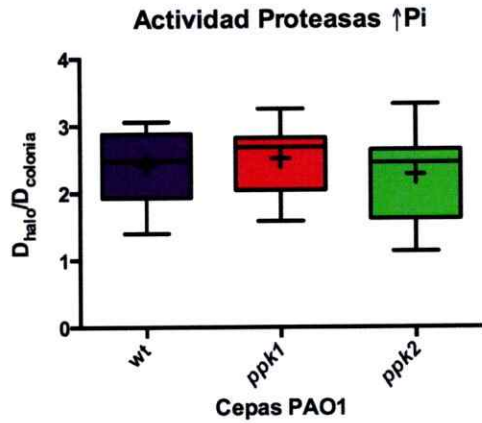
Estos ensayos se realizaron a todos los mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 en la síntesis de polifosfato y pigmentos tóxicos. Mediante el análisis estadístico no se observaron diferencias significativas entre las cepas al comparar las dos condiciones de fosfato, incluso la gran mayoría de las cepas mutantes se comporta de manera similar a la cepa silvestre en cuanto a las actividades de los factores de virulencia ensayados en los distintos agares indicadores. Sin embargo, sólo algunas cepas sí presentaron diferencias significativas cuando se les comparó en la misma situación de Pi con la cepa silvestre, tal es el caso de una mayor actividad elastasa del mutante *ppk1* en condición de alto fosfato ($p < 0,5$) y del mutante *pvdF* ($p < 0,5$) en condición de carencia de fosfato (Figura 13C). El mutante *phzS* presentó una menor actividad de proteasas en alto Pi (Figura 14B). De manera general para el resto se puede concluir que la actividad de hemolisina, proteasas, elastasa y ramnolipidos no presentan diferencias drásticas con respecto PAO1 wt en ambas condiciones de Pi. A pesar que *ppk1* presenta una amplia dispersión de datos

en cuanto a la actividad de hemolisina, se puede apreciar que alcanza valores mas altos que la cepa wt y *ppk2*.

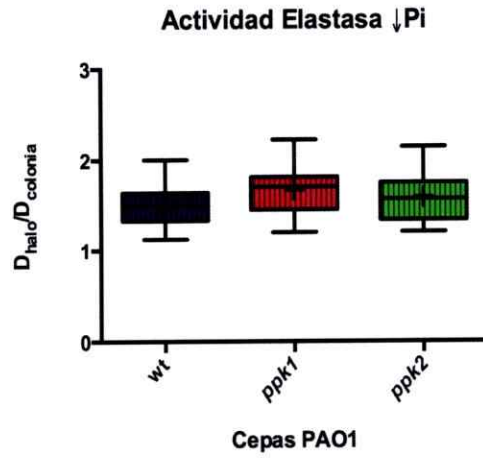
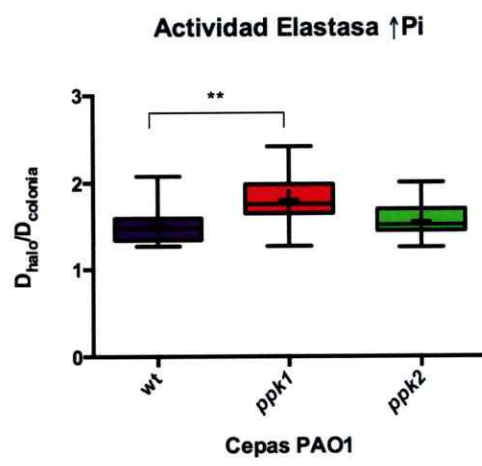
13A. Actividad Hemolisina



13B. Actividad de Proteasas



13C. Actividad Elastasa



13D. Actividad Ramnolipidos

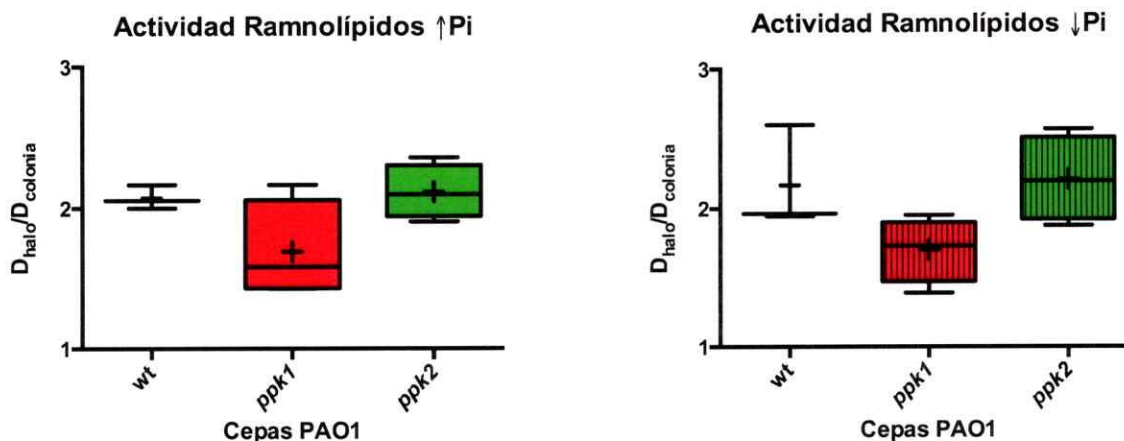
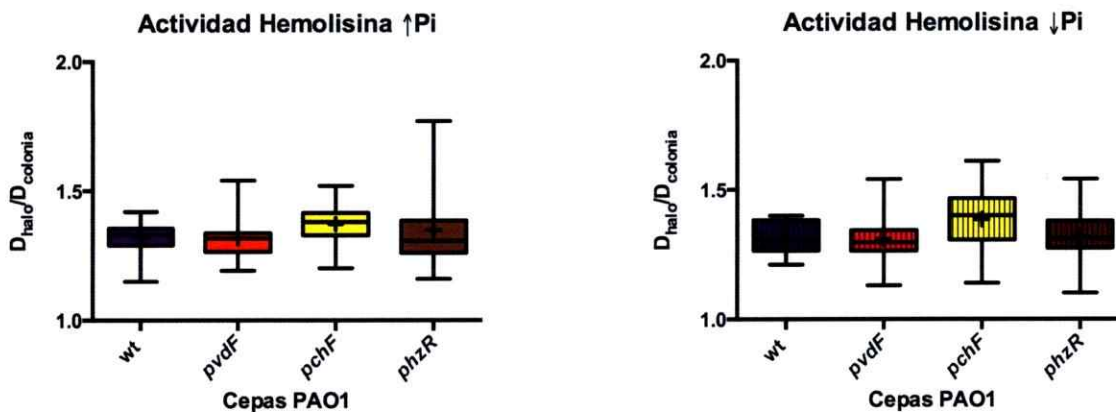
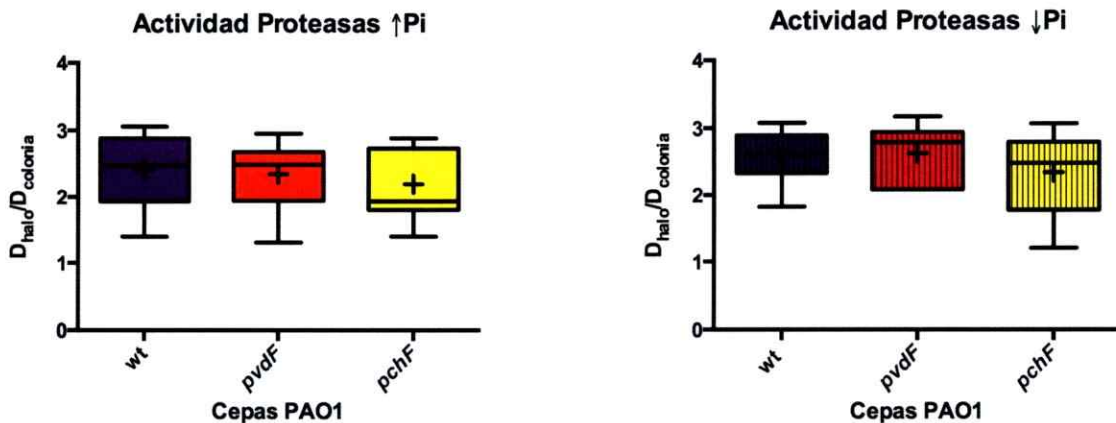


Figura 13: Ensayo de factores de virulencia de *mutantes de Pseudomonas aeruginosa en la síntesis de polifosfato* en agares indicadores específicos. Agar sangre para la actividad de hemolisina (A), agar elastina para la actividad de elastasa (B), agar leche para la actividad de proteasas (C) y agar CTAB para la acción de ramnolipidos (D). Los diámetros de los halos degradativos fueron medidos y estandarizados en base a los diámetros de las colonias bacterianas respectivas ($D_{halo}/D_{colonia}$) y están representados con graficos de caja y bigotes (box plot).

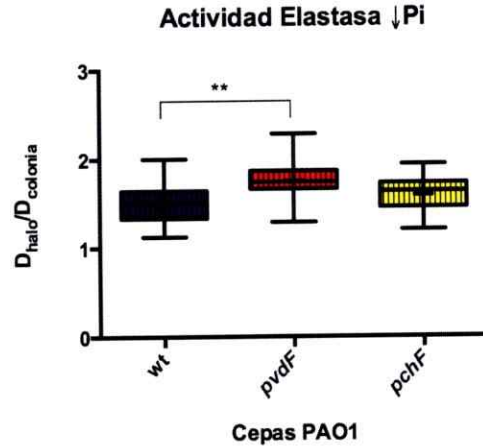
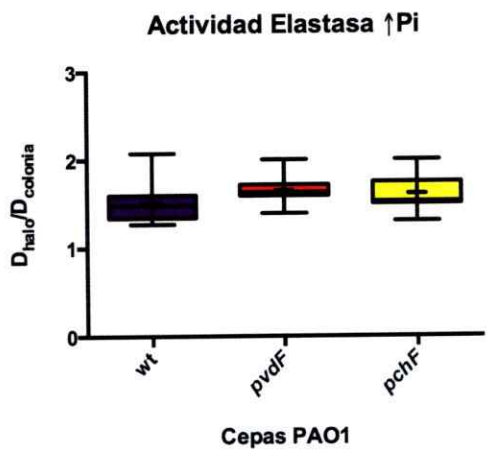
14A. Actividad hemolisina



14B. Actividad de Proteasas



14C. Actividad Elastasa



14D. Actividad Ramnolipidos

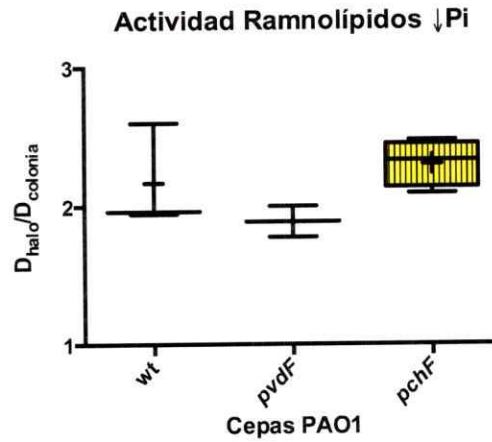
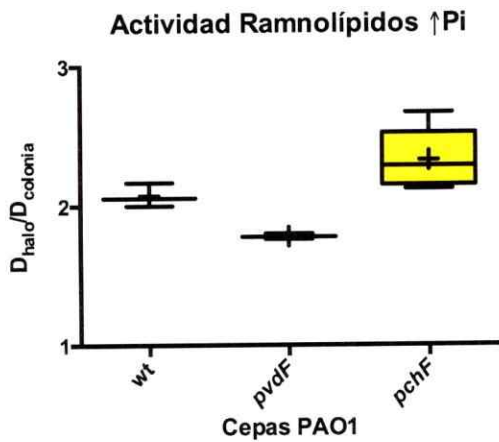
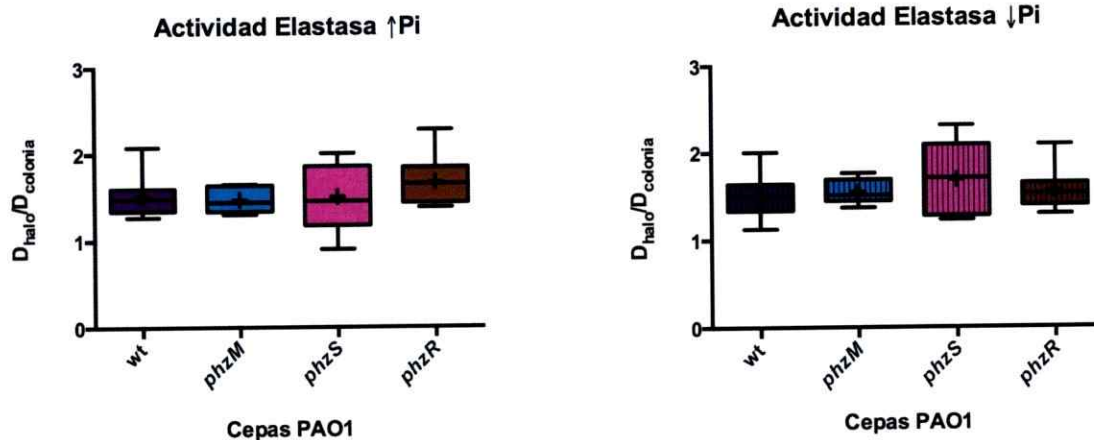
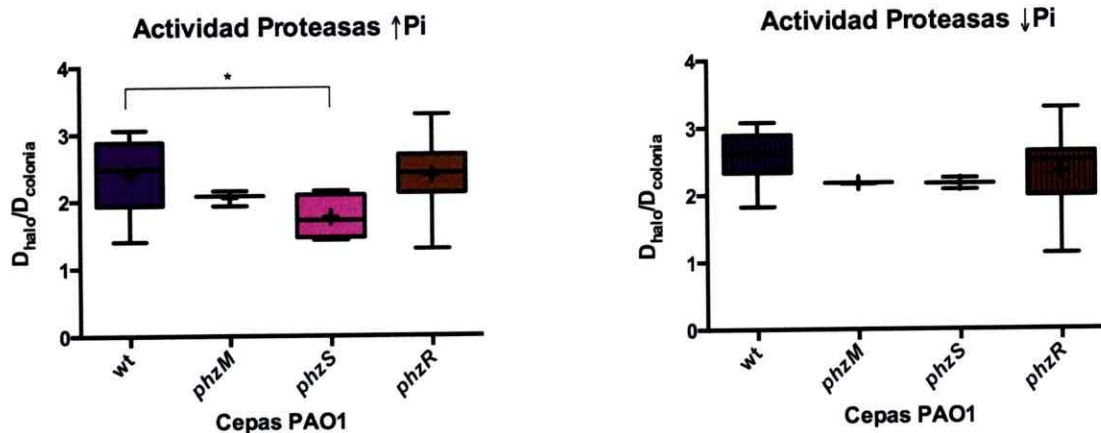


Figura 14: Ensayo de factores de virulencia de *mutantes de Pseudomonas aeruginosa de sideróforos* realizados en agares indicadores específicos. Agar sangre para la actividad de hemolisina (A), agar elastina para la actividad de elastasa (B), agar leche para la actividad de proteasas (C) y agar CTAB para la acción de ramnolipidos (D). Los diámetros de los halos degradativos fueron medidos y estandarizados en base a los diámetros de las colonias bacterianas respectivas ($D_{halo}/D_{colonia}$) y están representados con graficos de caja y bigotes (box plot). N=5.

15A. Actividad Elastasa



15B. Actividad de Proteasas



15C. Actividad Ramnolipidos

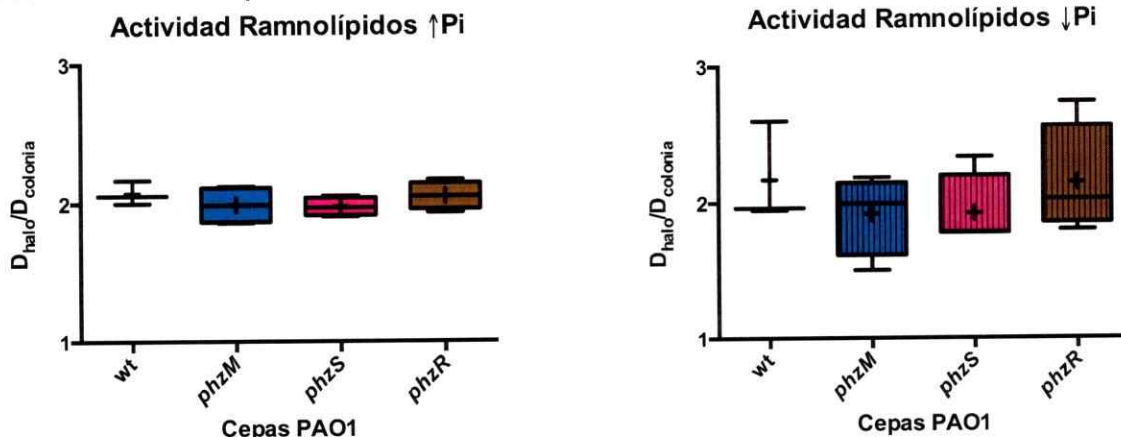


Figura 15: Ensayo de factores de virulencia de *mutantes de Pseudomonas aeruginosa en la síntesis de plicianina*. Agar elastina para la actividad de elastasa (A), agar leche para la actividad de proteasas (B) y agar CTAB para la acción de ramnolipidos (C). Los diámetros de los halos degradativos fueron medidos y estandarizados en base a los diámetros de las colonias bacterianas respectivas ($D_{halo}/D_{colonia}$) y están representados con graficos de caja y bigotes (box plot).

iv. Estudios de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en *Danio rerio*

Con vistas a determinar la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 utilizamos el pez cebra (*Danio rerio*) como hospedero y mediante ensayos de inmersión, cuantificamos la letalidad sobre el animal ante el desafío con las diferentes mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* en la síntesis de polifosfato y pigmentos tóxicos. Luego de contabilizar sobrevivencia de *Danio rerio* cada una hora, se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para las cepas mutantes y silvestre de *P. aeruginosa* PAO1. El análisis estadístico se basó en la prueba de Mantel-Cox donde el número de muertes por unidad de tiempo es la misma para todos los tiempos (razón de riesgo) y se realizó la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (el valor de $P=0,05$ es dividido por la cantidad de comparaciones realizadas). Se muestran los resultados de infección bacteriana de dos densidades ópticas a 600nm (0,525 y 0,35) para cada condición de fosfato (alto y bajo Pi) (Figura 16).

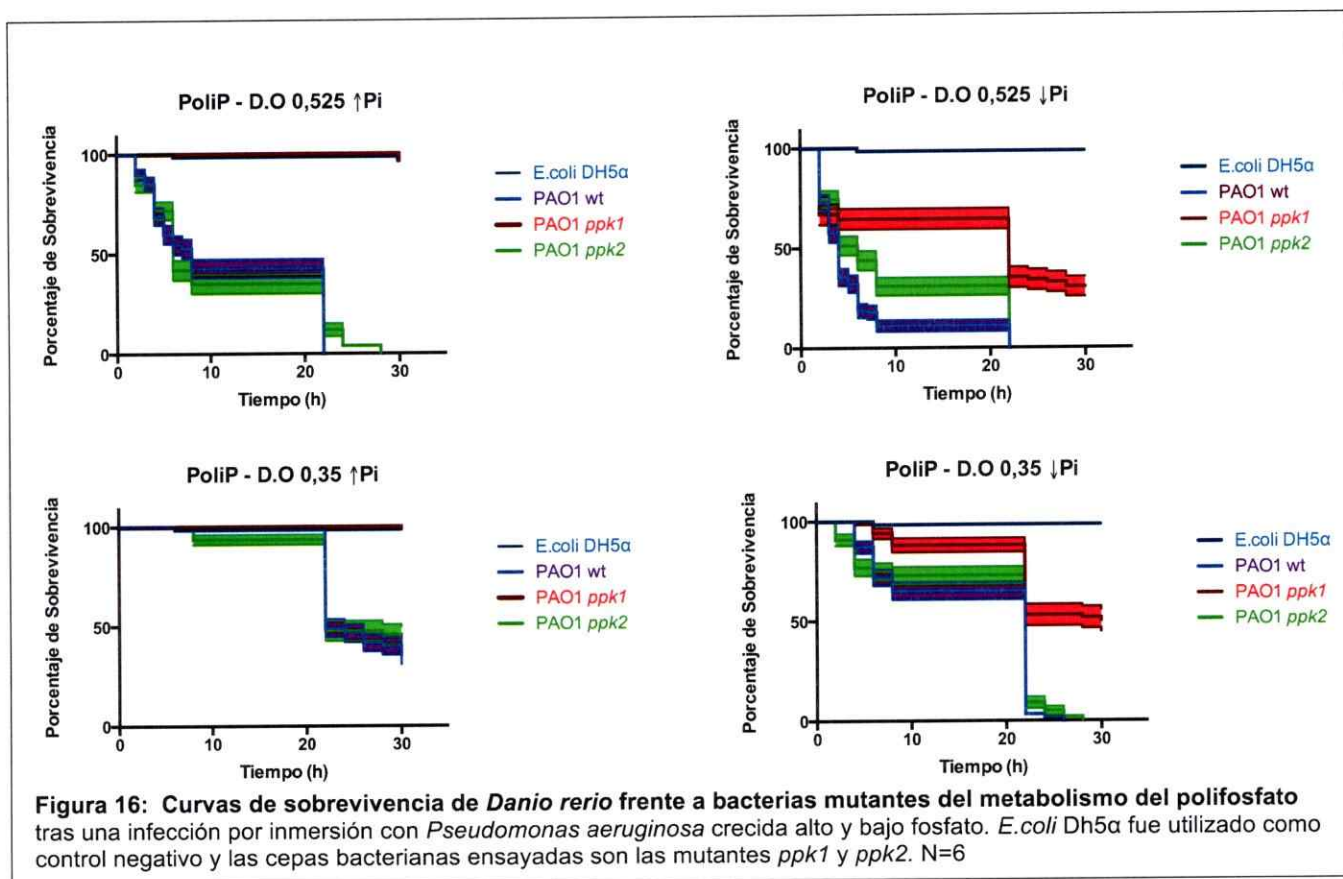
Todas las cepas ensayadas demostraron un aumento en su letalidad sobre el pez cuando se compara la carencia versus la ausencia de fosfato en el crecimiento bacteriano respectivo. En la Figura 16 se puede observar que la cepa silvestre (PAO1 wt) crecida en condición de alto fosfato disminuye el porcentaje de sobrevivencia de los peces a un 50% antes de las 10hrs de incubación en $D.O_{600nm}= 0,525$ y después de 20hrs en $D.O_{600nm}= 0,35$. En la condición opuesta de crecimiento el porcentaje de muerte de larvas es de un 90% aproximadamente a las 10hrs en $D.O_{600nm}= 0,525$ y de un 30-40% en $D.O_{600nm}= 0,35$.

A pesar de que la letalidad provocada por parte de la mutante *ppk1* en carencia de fosfato es al menos un 50% de las larvas, es bastante menor que la provocada por la PAO1 wt y la mutante *ppk2*, que llegan a matar el 100% de los individuos. Además *ppk1* no es letal en condición de alto fosfato, mientras que *ppk2* es similar a la cepa silvestre (Figura16). Esto demuestra que *ppk1* es una cepa avirulenta en condición de alto Pi y de letalidad reducida en bajo Pi, mientras que la cepa *ppk2* es altamente virulenta con comportamiento similar a PAO1 wt en ambas condiciones de Pi.

Con respecto a las mutantes de síntesis de sideróforos, la cepa *pvdF* resultó ser menos letal que *pchF* en ambas condiciones de crecimiento. A $D.O_{600nm}= 0,35$ en bajo Pi, *pvdF* mató a un 50% de peces aproximadamente, mientras que en alto Pi presentó una leve letalidad de apenas 10% (Figura 17). La mutante de síntesis de pioquelina (*pchF*) por otro lado, demostró ser altamente letal e incluso más que la cepa silvestre a $D.O_{600nm}= 0,525$ para ambas condiciones de Pi.

Las mutantes de la síntesis de piocianina resultaron ser similarmente letales entre ellas y sin mayor diferencia en comparación a la cepa silvestre (Figura 18). Sin embargo se puede observar que *phzR* posee un desfase en cuanto a la letalidad de las larvas en comparación con las dos cepas restantes para todos los casos.

Se puede inferir por lo tanto que la carencia de fosfato aumenta la virulencia de las mutantes del metabolismo de los polifosfatos y que la mutante *ppk1* no es virulenta cuando es crecida en presencia de fosfato y su virulencia es atenuada en condición de bajo Pi, en comparación con sus contrapartes, PAO1 wt y *ppk2*. Resultados similares a la mutante *ppk1* muestra la mutante de la síntesis de pioverdina (*pvdF*).



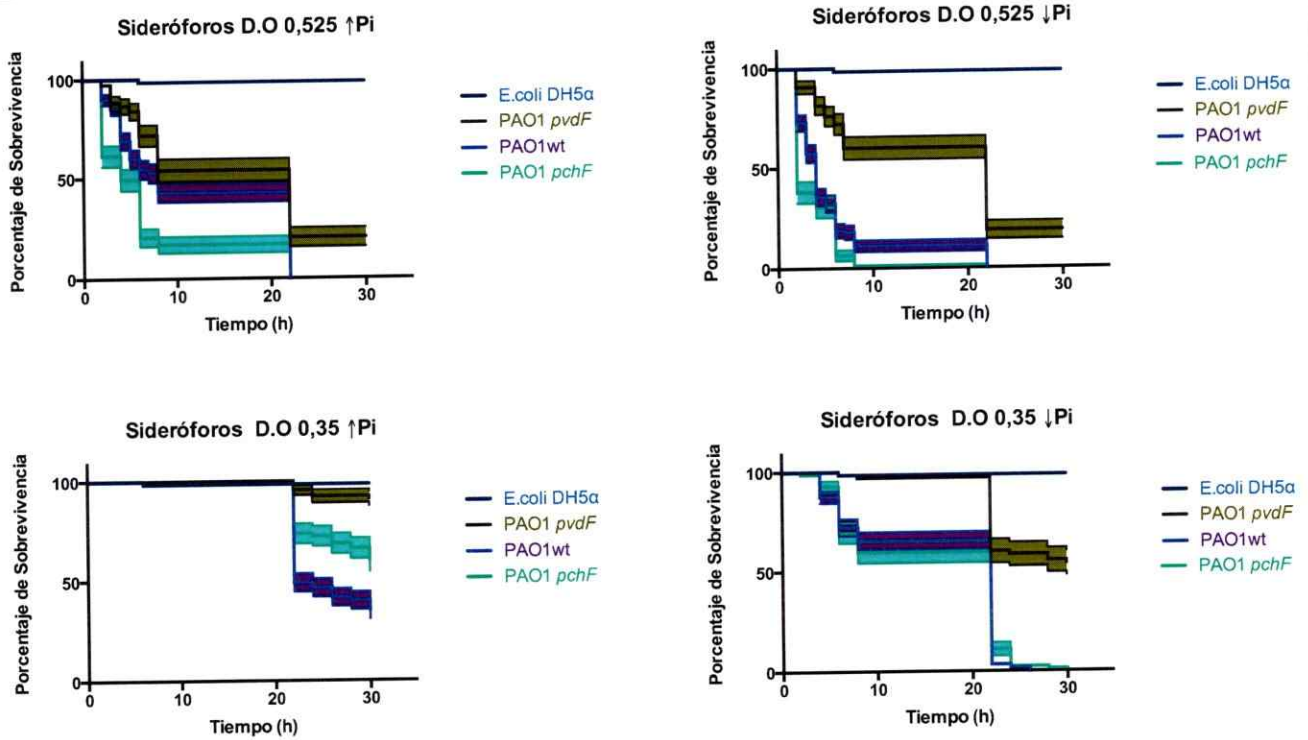


Figura 17: Curvas de supervivencia de *Danio rerio* frente a bacterias mutantes de la síntesis de sideróforos tras una infección por inmersión con *Pseudomonas aeruginosa* crecida alto y bajo fosfato. *E.coli* Dh5α fue utilizado como control negativo y las cepas bacterianas ensayadas son *pvdF* y *pchF*. N=6

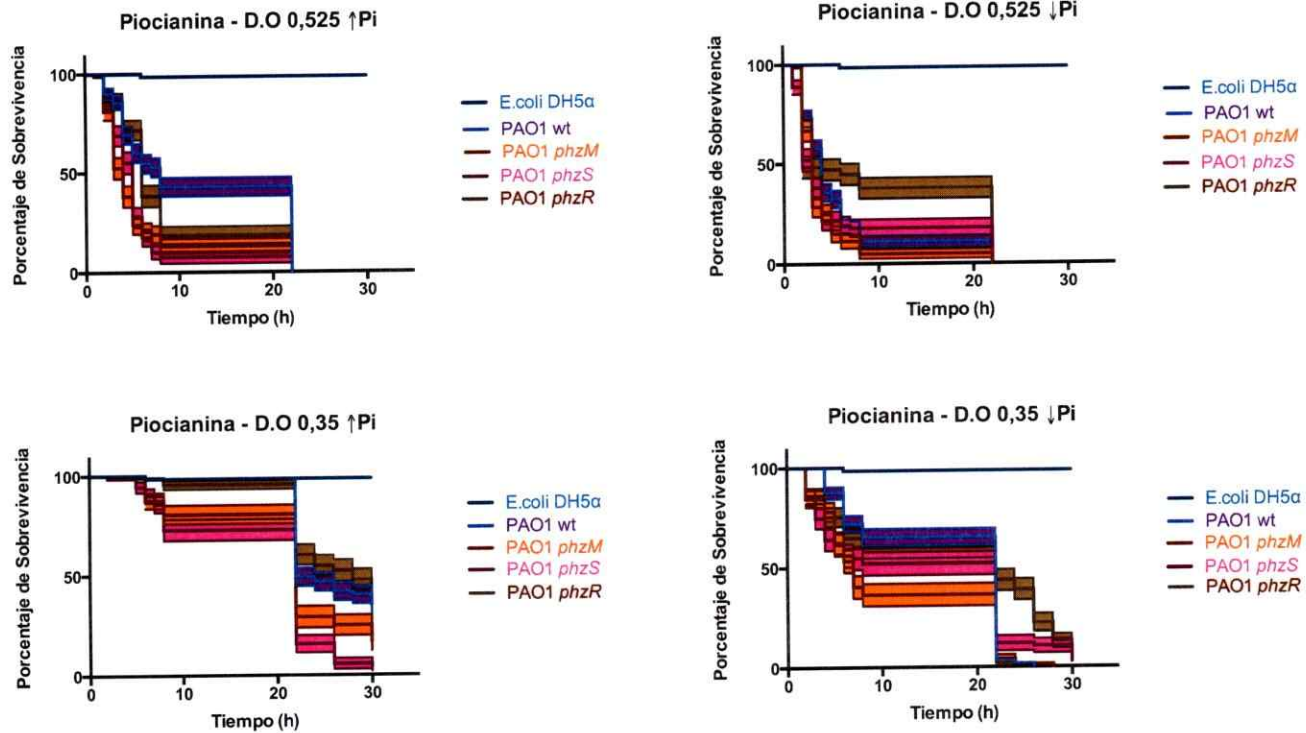


Figura 18: Curvas de supervivencia de *Danio rerio* frente a bacterias mutantes de la síntesis de piocianina tras una infección por inmersión con *Pseudomonas aeruginosa* crecida alto y bajo fosfato. *E.coli* Dh5α fue utilizado como control negativo y las cepas bacterianas ensayadas son *phzR*, *phzM* y *phzS*. N=6

IV. Discusión

El objetivo general propuesto para el presente seminario de título fue determinar la producción de factores de virulencia de las cepas mutantes del metabolismo de los poliP y de la síntesis de sideróforos y pigmentos tóxicos de PAO1 así como la letalidad de las mismas utilizando *Danio rerio* como modelo animal.

La producción de los factores de virulencia se analizó mediante la cuantificación y estimación de los pigmentos tóxicos producidos por *P.aeruginosa*, además de la producción de cuatro importantes factores de virulencia producidos por *Pseudomonas aeruginosa* (hemolisina, ramnolípidos, proteasa y elastasa). Esto combinado con los ensayos de inmersión para determinar la letalidad de la bacteria en larvas del pez cebra de 3dpf nos permitió determinar qué factores de virulencia son importantes para la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 en el pez cebra y cuáles podrían ser las causas de la virulencia diferencial de los mutantes de la síntesis de los poliP (*ppk1* y *ppk2*).

En el primer objetivo estimamos la producción de sideróforos totales y cuantificamos los pigmentos tóxicos, piocianina y pioverdina, en las mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* del metabolismo de los polifosfatos (*ppk1* y *ppk2*) y pigmentos tóxicos (*pvdF*, *pchF*, *phzM*, *phzS* y *phzR*) en dos condiciones de fosfato (alto Pi y bajo Pi). Para determinar los cambios en la producción se realizó 1) la cuantificación por absorbancia de Piocianina y Pioverdina presentes en muestras de secretoma de las cepas bacterianas de *P.aeruginosa* y 2) el ensayo de difusión en agar CAS (Shin y col ,2001) para la estimación de sideróforos totales.

La cantidad de Piocianina aumentó en la condición de bajo Pi con respecto a la opuesta para la mayoría de las cepas bacterianas, a excepción de las mutantes involucradas en la síntesis del pigmento (*phzM*, *phzS* y *phzR*) que incluso produjeron notoriamente menos piocianina que la cepa control PAO1 wt en bajo Pi (Figura 9). La mutantes *ppk1*, *pvdF* y *pchF* resultaron producir significativamente menor cantidad del pigmento tóxico cuando se les comparó con la cepa silvestre en la condición de alto fosfato. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura ya que en condiciones de bajos niveles de fosfato, los niveles de pigmentos tóxicos aumentan (Zaborin y col., 2009; Long y col., 2008).

Por el otro lado, la cantidad de pioverdina secretada resultó afectada en la mayoría de las cepas mutantes, en especial para *ppk1* y *pvdF* que produjeron significativamente menos pioverdina en ambas condiciones de fosfato con respecto a la wt. Esto se correlaciona con el fenotipo azul observado tras el cultivo de ambas cepas en carencia de Pi, indicando mayoritariamente presencia

de piocianina y reducido color de pioverdina (amarillo). Curiosamente en los ensayos de letalidad en el pez cebra solo las cepas *ppk1* y *pvdF* tienen un fenotipo de virulencia atenuado, lo que sugiere que la pioverdina es un factor de virulencia esencial para causar daño en el pez cebra. Además se ha reportado que mutantes deficientes en la síntesis de pioverdina son menos virulentos en ratón (Meyer y col, 1996). Adicionalmente en nuestros ensayos de inmersión el único mutante de la producción de pigmentos tóxicos que tuvo un fenotipo de virulencia atenuada fue *pvdF* lo que sugiere que el resto de los pigmentos no son esenciales para causar daño en el pez cebra.

Por su parte la cepa mutante de la síntesis de pioquelina (*pchF*), presentó similares niveles de pioverdina que la cepa control demostrando que la mutación presente no afecta la producción del otro sideróforo. La cantidad de pioverdina en el secretoma de la mutante *ppk2* fue notoriamente mayor que la de *ppk1* en ambas condiciones de Pi. Sin embargo el nivel de este sideróforo fue menor que el producido por la cepa silvestre en alto Pi. Dentro de las mutantes en la síntesis de piocianina, *phzR* y *phzM* tuvieron menor cantidad de pioverdina que la cepa *phzS* cuando se les comparó respectivamente con PAO1 wt en ambas situaciones de Pi.

Nuestros resultados apuntan a que el mutante *ppk1* tiene una disminución de los niveles de pioverdina y esto podría ser uno de los factores de virulencia que contribuyen al fenotipo de virulencia atenuado. Sin embargo, ¿qué otros factores de virulencia están afectados en el mutante *ppk1* de *P. aeruginosa* PAO1?

Para contestar esta pregunta realizamos 4 sencillos ensayos que permiten estimar la producción de factores de virulencia tanto en los mutantes de la síntesis de los poliP (*ppk1* y *ppk2*) como también en los mutantes de producción de pigmentos tóxicos.

Estos experimentos, fueron realizados en base a agares indicadores específicos que permitieron comparar la producción de hemolisina, ramnolípidos, proteasa y elastasa en las ocho cepas derivadas de *P.aeruginosa* PAO1. La gran mayoría de las cepas mutantes no presentó diferencias significativas con respecto al control para los cuatro factores de virulencia ensayados. Sin embargo, las mutantes *ppk1* y *pvdF* presentaron una mayor actividad de elastasa en alto y bajo Pi respectivamente y una reducida actividad de proteasas en caso de la mutante *phzS* en alto Pi. Estos resultados sugieren que ningún otro factor de virulencia disminuye sus niveles en la cepa mutante *ppk1* en comparación con la cepa silvestre. Estos estudios sugieren que de todos los factores de virulencia ensayados en *P. aeruginosa*, la pioverdina es el más relevante en el pez cebra.

Finalmente realizamos ensayos de infección mediante inmersión en larvas del pez cebra. En ensayos previos realizados en el laboratorio (Ortíz-Severín, J., 2012) se había demostrado el fenotipo diferencial entre los mutantes *ppk1* y *ppk2* de *P. aeruginosa* PAO1 y se estableció el protocolo de inmersión para los ensayos de virulencia en larvas de 3 dpf (Figura 6). Sin embargo, no se conocía el fenotipo de los mutantes de sideróforos y de piocianina estudiados en esta tesis.

El protocolo de este experimente fue diseñado en base a experiencia previa del laboratorio (Ortíz-Severín, J., 2012), donde la temperatura a 22°C de co-incubación de las larvas y bacterias favorece el debilitamiento del sistema inmune del pez cebra para favorecer la infección bacteriana por inmersión. La edad de la larva utilizada (3dpf), permite estudiar los efectos de *P.aeruginosa* en el sistema inmune primitivo que el pez ya posee a dicha edad (Figura 19), lo cual es una gran ventaja para poder estudiar la virulencia de patógenos y su posterior relación con otros vertebrados. Al utilizar dos concentraciones bacterianas para la infección, se demuestra que una mayor D.O_{600nm} bacteriana, aumenta la mortalidad del pez cebra para ambas condiciones de Pi.

Primero confirmamos que el mutante *ppk1* del metabolismo del poliP presentó una virulencia atenuada con respecto a la cepa silvestre tanto en condición de alto Pi como de bajo Pi. Este fenotipo de virulencia atenuada ha sido observada en modelos murinos (Rashid y col, 2000) por lo que reproducir dichos resultados en el pez cebra, ratifica su uso como modelo hospedero-patógeno para el estudio de dicha interacción. Interessantemente, la virulencia diferencial entre *ppk1* y *ppk2* confirma resultados previos de nuestro laboratorio en la ameba social *D.discoideum*, donde la cepa *ppk1* también posee una virulencia atenuada con respecto a PAO1 wt, mientras que el mutante *ppk2* resultó ser similar o más virulento que la cepa control para la ameba (Bravo-Toncio, C., 2015). Por el otro lado, la mutante *ppk2* generó una letalidad similar al control en ambas condiciones de fosfato, siendo más letales en el tiempo en la condición de bajo Pi con respecto a la de alto, como se observa que la letalidad no alcanzó el 100% con la D.O_{600nm} de 0,525 en alto Pi. Nuestros resultados confirman entonces que la condición de fosfato en el medio es esencial para la virulencia de *P. aeruginosa* PAO1 en ensayos de inmersión en el pez cebra y que el mutante *ppk1* tiene una virulencia atenuada.

En este trabajo se pudo determinar la virulencia de numerosos mutantes de pigmentos tóxicos en los ensayos de inmersión con larvas (3 dpf) de pez cebra. De manera similar a la *ppk1*, la mutante de la síntesis de pioverdina también mostró una letalidad atenuada en comparación a la cepa silvestre y a la mutante en la síntesis del sideróforo pioquelina. La mutante *pchF* resultó tener similares curvas de sobrevivencia de las larvas con PAO1 wt a una D.O_{600nm} de 0,35. Sin embargo a una mayor concentración bacteriana, se observa que *pchF* puede ser incluso más letal que la cepa

control en alto Pi, observándose la mayor reducción de sobrevivencia luego de 10 horas de la infección. Un comportamiento similar también se observó en el modelo *D. Discoideum*, donde *pchF* y la cepa silvestre resultaron ser altamente virulentos, mientras que la cepa *pvdF* permite el desarrollo social de la ameba por lo que presenta un fenotipo de virulencia atenuada. Con respecto a las cepas mutantes de las síntesis de piocianina, las tres cepas redujeron la sobrevivencia del pez cebra de manera más drástica que la cepa control, observándose claramente una menor letalidad de esta última luego de 10 horas de infección en todas las concentraciones ensayadas.

La virulencia atenuada mostrada en los ensayos de inmersión del pez cebra por la mutante en la síntesis de los poliP (*ppk1*) contrasta con la del mutante *ppk2* lo que se correlaciona con la disminución de la producción del sideróforo pioverdina. Esto sumado a que el mutante de la síntesis de pioverdina (*pvdS*) también mostró estos fenotipos y que la pioverdina fue el único de los factores de virulencia que fue contrastante entre los mutantes *ppk1* y *ppk2* es que comprobamos que nuestra hipótesis es verdadera. "La diferencia en la virulencia observada en las cepas *ppk1* y *ppk2* de *Pseudomonas aeruginosa* en el pez cebra, se debe a la expresión diferencial de sideróforos y pigmentos tóxicos". Nuestros resultados sugieren que particularmente la pioverdina sería el factor de virulencia que en nuestros ensayos resultó esencial para causar daño en el pez cebra.

V. Conclusiones

Mediante el presente seminario se logró estudiar la virulencia de las cepas mutantes del metabolismo de los poliP, de la síntesis de sideróforos y pigmentos tóxicos de *P.aeruginosa*, bajo condiciones de crecimiento diferenciales de fosfato, utilizando *Danio rerio* como modelo animal *in vivo*. Se confirma que la virulencia se relaciona con el metabolismo de los polifosfatos, y se estableció que dicha diferencia se asocia a una producción diferencial de factores de virulencia.

De todos los factores de virulencia ensayados (Pigmentos tóxicos, elastasa, proteasa, ramnolípidos y hemolisina) el sideróforo pioverdina sería esencial para causar daño en los ensayos de inmersión con larvas (3dpf) de pez cebra.

Los niveles diferenciales de pioverdina se correlacionan con el fenotipo atenuado de virulencia mostrado por los mutantes *ppk1* y *pvdS*, así como con el fenotipo virulento del mutante *ppk2*.

Perspectivas

Los ensayos de infección con larvas en el pez cebra son una herramienta para la búsqueda de nuevos compuestos antivirulencia contra patógenos del género *Pseudomonas* y que tengan como blanco la síntesis de los poliP y de pioverdina.

Estos ensayos también permitirán estudios *in vivo* de la respuesta molecular y celular de la interacción patógeno-hospedero. Mediante el uso de tecnologías ómicas y utilizando líneas trasngénicas tanto del pez cebra como de las bacterias patógenas es posible descifrar mecanismos *in vivo* que luego puedan ser verificados en modelos murinos.



VI. Bibliografía

- Achbergerová, L., Nahálka, J. 2011. Polyphosphate, an ancient energy source and active metabolic regulator. *Microbial Cell factories*. 10:63.
- Bates, J. M., E. Mittge, J. Kuhlman, K. N. Baden, S. E. Cheesman, and K. Guillemin. 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev Biol* 297:374-86.
- Bejarano, P.A., Langeveld, J.P., Hudson, B.G., and Noelken, M.E. 1989. Degradation of basement membranes by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun* 57: 3783-3787.
- Bravo-Toncio, C. 2015. Estudios fenotípicos de la virulencia de *pseudomonas aeruginosa* pao1 utilizando como modelo de infección la ameba *Dictyostelium discoideum*. Director: Francisco P. Chávez. *Tesis de Magíster no publicada*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Santiago, Chile
- Casadevall, A. 2008. *Microbiota and Regulation of the Immune System*, edited by Gary B. Huffnagle and Mairi C. Noverr. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media.
- Casadevall, A., and L. A. Pirofski. 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 1:17-24.
- Chun, C.K., Ozer, E.A., Welsh, M.J., Zabner, J., and Greenberg, E.P. 2004 Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3587-3590
- Clatworthy AE, Lee JS, Leibman M, Kostun Z, Davidson AJ, Hung DT. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* infection of zebrafish involves both host and pathogen determinants. *Infect Immun*. 77(4):1293-1303
- Cunliffe, H.E., Merriman, T.R., and Lamont, I.L. 1995. Cloning and characterization of pvdS, a gene required for pyoverdine synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: PvdS is probably an alternative sigma factor. *J Bacteriol* 177: 2744-2750
- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W., and Greenberg, E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280: 295-298.
- Déziel, E., Gopalan, S., Tampakaki, A.P., Lépine, F., Padfield, K.E., Saucier, M., Xiao, G., and Rahme, L.G. 2005. The contribution of MvfR to *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis and quorum sensing circuitry regulation: multiple quorum sensing-regulated genes are modulated without affecting lasRI, rhlRI or the production of N-acyl-L-homoserine lactones. *Mol Microbiol* 55: 998-1014.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., and Villemur, R. 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149: 2005-2013.
- Diggle, S.P., Cornelis, P., Williams, P., and Cámara, M. 2006. 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Old molecules, new perspectives. *Int J Med Microbiol* 296: 83-91.
- Entner, N., and R. Y. Stanier. 1951. Studies on the oxidation of glucose by *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 62:181-6.
- Eschbach, M., K. Schreiber, K. Trunk, J. Buer, D. Jahn, and M. Schobert. 2004. Long-Term Anaerobic Survival of the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via Pyruvate Fermentation. *Journal of Bacteriology* 186:4596-4604.
- Frimmersdorf, E., S. Horatzek, A. Pelnikovich, L. Wiehlmann, and D. Schomburg., 2010. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environmental Microbiology* 12:1734-1747.
- Ginn-Pease, M. E., and R. L. Whisler. 1998. Redox signals and NF-kappaB activation in T cells. *Free Radic Biol Med* 25:346-61.
- Goldbourn, A., L. A. Day, and A. E. McDermott. 2007. Assignment of congested NMR spectra: Carbonyl backbone enrichment via the Entner-Doudoroff pathway. *Journal of Magnetic Resonance* 189:157-165.

- Handfield, M., Lehoux, D.E., Sanschagrín, F., Mahan, M.J., Woods, D.E., and Levesque, R.C., 2000. In vivo-induced genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 68: 2359-2362.
- Handfield, M., Lehoux, D.E., Sanschagrín, F., Mahan, M.J., Woods, D.E., and Levesque, R.C. 2000. In vivo-induced genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 68: 2359-2362.
- Hassett, D.J., Charniga, L., Bean, K., Ohman, D.E., and Cohen, M.S. 1992. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infect Immun* 60: 328-336
- Hauser, A.R., and Engel, J.N. 1999 *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. *Infect Immun* 67: 5530-5537
- Jacobs, M. A. 2003. Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:14339-14344.
- Kornberg, A., N. N. Rao, and D. Ault-Riché. 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68:89-125.
- Kurz, C.L., and Ewbank, J.J. 2007 Infection in a dish: high-throughput analyses of bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 10: 10–16.
- Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H., and Kong, F. 2004a The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* 10: 599-606.
- Lau, G.W., Ran, H., Kong, F., Hassett, D.J., and Mavrodi, D. 2004b *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* 72: 4275-4278.
- Long J, Zaborina O, Holbrook C, Zaborin A, Alverdy J. 2008. Depletion of intestinal phosphate after operative injury activates the virulence of *P. aeruginosa* causing lethal gut-derived sepsis. *Surgery.* 144:189-97.
- Lyczak J, Cannon C, Pier G 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection,* 2000 1051–1060.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G., and Ausubel, F.M. 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47-56.
- Martin L.W, Reid DW, Sharples KJ, Lamont IL. 2011. *Pseudomonas* siderophores in the sputum of patients with cystic fibrosis. *Biometals,* in press.
- Meeker, N. D., and N. S. Trede. 2008. Immunology and zebrafish: spawning new models of human disease. *Dev Comp Immunol* 32:745-57.
- Meyer, J.M., Neely, A., Stintzi, A., Georges, C., and Holder, I.A. 1996. Pyoverdín is essential for virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64: 518-523
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55: 165-199.
- Ochsner, U.A., and Reiser, J. 1995. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6424-6428.
- 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.
- Passador, L., Cook, J.M., Gambello, M.J., Rust, L., and Iglewski, B.H. 1993. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 260:1127-1130.
- Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P., and Iglewski, B.H. 1999 Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 96: 11229-11234.

- Poole, K., and McKay, G.A. 2003. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front Biosci* 8: 661-686.
- Rashid, M., K. Rumbaugh, L. Passador, D. Davies, A. Hamood, B. Iglewski, and A. Kornberg. 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9636-41.
- Roychoudhury, S., K. Sakai, and A. M. Chakrabarty. 1992. AlgR2 is an ATP/GTP-dependent protein kinase involved in alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2659-63.
- Scheie, A.A., and Petersen, F.C. 2004. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 15: 4-12
- Shen, D.K., Filopon, D., Chaker, H., Boullanger, S., Derouazi, M., Polack, B., and Toussaint, B. 2008. High-cell-density regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: implications for tryptophan catabolites. *Microbiology* 154: 2195-2208.
- Singh, P.K., Schaefer, A.L., Parsek, M.R., Moninger, T.O., Welsh, M.J., and Greenberg, E.P. 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 407: 762-764
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-64.
- Tommassen, J., Filloux, A., Bally, M., Murgier, M., and Lazdunski, A. 1992. Protein secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 9: 73-90.
- Van Delden C., Iglewski B. 1998. Cell-to-Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerging Infectious Disease*. 4 (4): 551-560
- Varela C., Mauriaca C., Paradela A., Albar J.P., Jerez C.A., y Chávez F.P. 2009. New structural and functional defects in polyphosphate deficient bacteria: A cellular and proteomic study. *BMC Microbiol*. 12:10-7
- Wagner, V.E., Frelinger, J.G., Barth, R.K., and Iglewski, B.H. 2006a Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol* 14: 55-58.
- Wilson, R., Sykes, D.A., Watson, D., Rutman, A., Taylor, G.W., and Cole, P.J. 1988. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium. *Infect Immun* 56: 2515-2517.
- Yahr, T.L., and Parsek, M.R. 2006 *Pseudomonas aeruginosa*. *Prokaryotes* 6: 704-713.
- Yanagihara, K., Tomono, K., Kaneko, Y., Miyazaki, Y., Tsukamoto, K., Hirakata, Y., Mukae, H., Kadota, J., Murata, I., and Kohno, S. 2003. Role of elastase in a mouse model of chronic respiratory *Pseudomonas aeruginosa* infection that mimics diffuse panbronchiolitis. *J Med Microbiol* 52: 531-535
- Zaborin A, Romanowski K, Gerdes S, Holbrook C, Lepine F, Long J, Poroyko V, Diggle SP, Wilke A, Righetti K, Morozova I, Babrowski T, Liu DC, Zaborina O, Alverdy JC. 2009. Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:6327-32.
- Zhang, H., K. Ishige, and A. Kornberg. 2002. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16678-83.
- Zulianello, L., Canard, C., Köhler, T., Caille, D., Lacroix, J.S., and Meda, P. 2006 Rhamnolipids are virulence factors that promote early infiltration of primary human airway epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 74: 3134-3147

VII. Anexos

3dpf: Exposure for 30 hours to
with *P.aeruginosa* in static
immersion system (22°C)

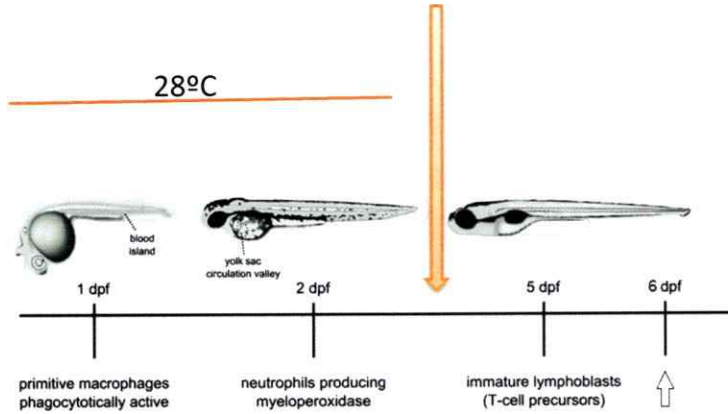


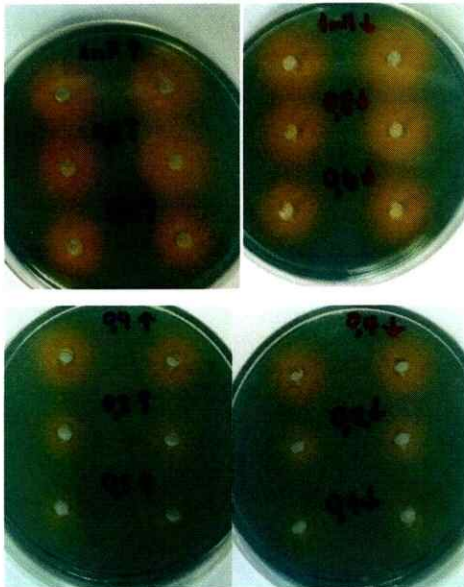
Figura 19: Desarrollo del sistema inmune en *Danio rerio*.

El crecimiento de los huevos hasta desarrollo larval de 2dpf se mantuvo a 28°C y a los 3 dpf fueron sometidos a la infección por inmersión bacteriana y mantenidos a 22°C durante las 30 horas de experimentos.

Curva de calibración de Desferal

↑Pi

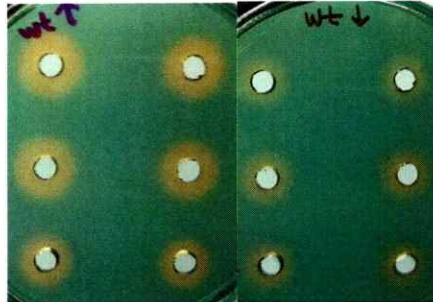
↓Pi



PAO1 WT

↑Pi

↓Pi



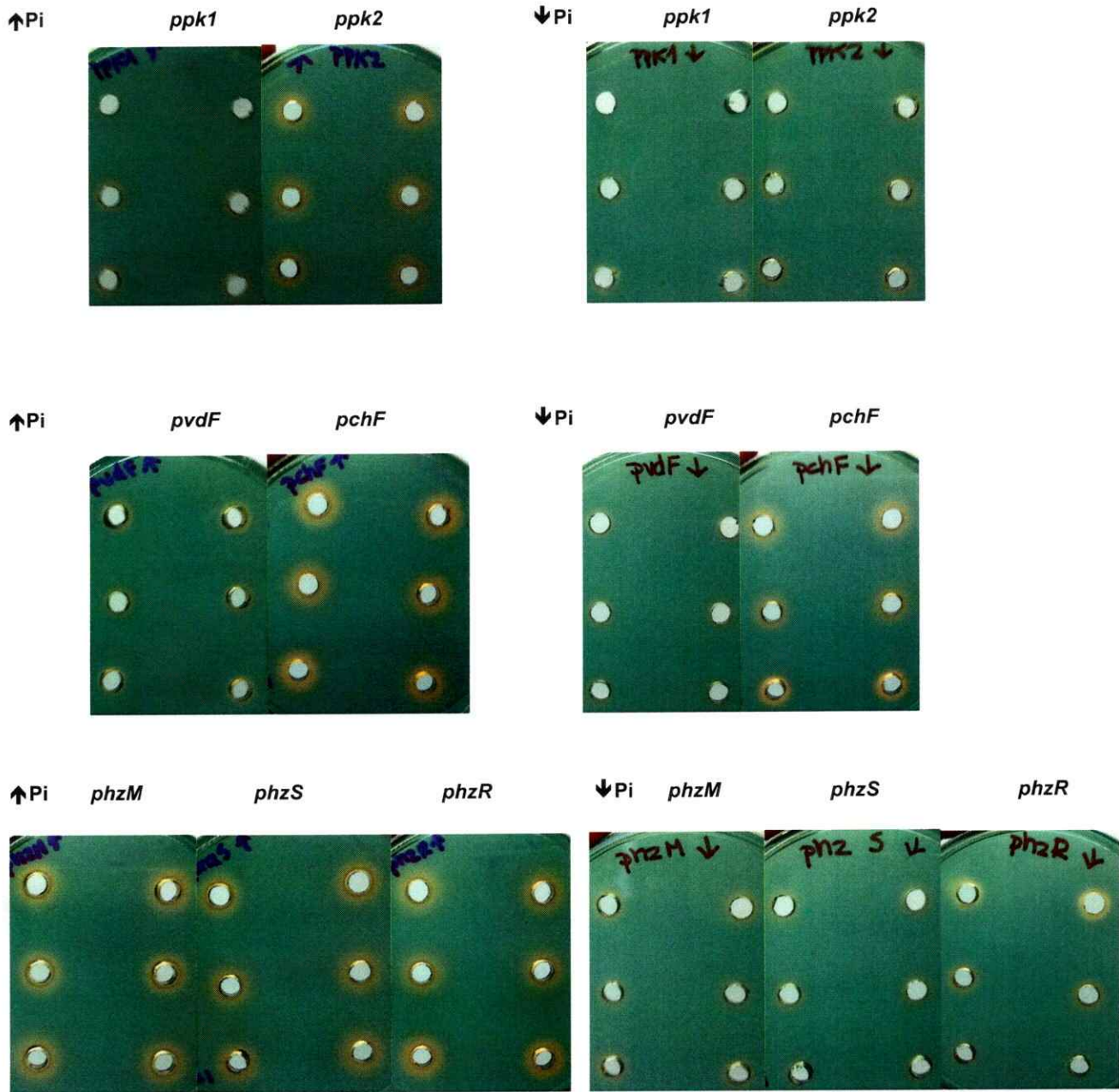


Figura 20: Curvas de calibración Desferal. La concentración de desferal varió de 0,1 a 1mM y fue disuelto en los medios PGS alto Pi y PGS bajo Pi de manera independiente.